

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL  
PROCESO DE APOPTOSIS DURANTE LA OSIFICACIÓN DE LA  
CÁPSULA ÓTICA EN UN MODELO MURINO**

**POR**

**MÓNICA TAYDE YÁÑEZ CABALLERO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**ENERO 2014**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE EMBRIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**



**TESIS**

**ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL PROCESO DE  
APOPTOSIS DURANTE LA OSIFICACIÓN DE LA CÁPSULA ÓTICA EN UN  
MODELO MURINO**

**Presenta**

**Q.C.B. Mónica Tayde Yáñez Caballero.**

**Como Requisito Parcial Para Obtener El Grado De Maestría En Ciencias con  
Orientación en Morfología**

**Enero 2014**

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL PROCESO DE  
APOPTOSIS DURANTE LA OSIFICACIÓN DE LA CÁPSULA ÓTICA EN UN  
MODELO MURINO.

Aprobación de la Tesis:

---

DR. MED. NORBERTO LOPEZ SERNA  
Director

---

DR. MED. ALFREDO NÚÑEZ CASTRIUTA  
Co-Director

---

Ph. D. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA  
Comisión de Tesis

---

DR. MED. SANTOS GUZMÁN LÓPEZ  
Director Facultad de Medicina

---

DR. MED. GERARDO E. MUÑOZ MALDONADO  
Subdirector de Estudios de Posgrado

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL PROCESO DE  
APOPTOSIS DURANTE LA OSIFICACIÓN DE LA CÁPSULA ÓTICA EN UN  
MODELO MURINO.

Presentado por :  
Q.C.B. Mónica Tayde Yáñez Caballero.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. med. Norberto López Serna y la Co-dirección del Dr. med. Alfredo Castruita Flores, así como en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Co-dirección del Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

Firmas:

---

Dr. med. Norberto López Serna  
Director de Tesis

---

Dr. med. Alfredo Castruita Flores  
Co-Director de Tesis

---

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra  
Comisión de Tesis



## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION . . . . .	10
1.1 Breve Introducción a la Ingeniería Genética . . . . .	10
1.2 Las Hormonas del Crecimiento . . . . .	11
1.2.1 Estructura . . . . .	11
1.2.2 Función . . . . .	11
1.2.3 Clonación. . . . .	12
1.3 El Caso de la Hormona del Crecimiento Bovino (bGH) . . . . .	13
1.4 Objetivos del Trabajo . . . . .	17
2. MATERIALES Y METODOS . . . . .	18
2.1 Origen de los Reactivos . . . . .	18
2.2 Material Biológico . . . . .	18
2.3 Estrategia de Trabajo Desarrollada . . . . .	18
2.3.1 Vector de Expresión Procariótica pKK233-2 . . . . .	20
2.3.2 Estrategia de Subclonación del ADNc Nativo de bGH . . . . .	21
2.3.3 Alteración de los Primeros 24 Codones del ADNc de bGH . . . . .	23
2.3.4 Estrategia de Subclonación del ADNc de hGH en el Vector de Expresión . . . . .	26
2.3.5 Estrategia para Expresión de ARNm y Proteínas . . . . .	28
2.4 Métodos . . . . .	28
2.5 Preparación de Bacterias Ca++ Competentes de <i>E. Coli</i> . . . . .	28
2.6 Minipreparación de Plásmidos por el Método de Lisis Alcalina . . . . .	30
2.7 Preparación de Plásmidos a Gran Escala . . . . .	31
2.8 Electroelución de Fragmentos de Restricción . . . . .	33
2.9 Extracción Fenólica . . . . .	35
2.10 Precipitación de ADN con Etanol . . . . .	36
2.11 Desfosforilación de los Extremos Pvu II del Vector pKKoligo . . . . .	36

2.12	Formación de Extremos Romos Usando ADN Polimerasa T4 . . . . .	37
2.13	Purificación de ADN de Fragmentos de Agarosa de Bajo Punto de Fusión por el Método GENECLEAN . . . . .	38
2.14	Ensayos de Expresión para las Clonas de <i>E. Coli</i> Portadoras de los Plásmidos Recombinantes . . . . .	39
2.15	Extracción de ARN de Bacterias . . . . .	40
2.16	Separación de ARNs en gel de Agarosa Urea-Acido . . . . .	42
2.17	Análisis de ARNs Tipo "Northern" . . . . .	43
2.17.1	Electroforesis de ARN Desnaturalizado con Glioxal. . . . .	43
2.17.2	Transferencia a Filtro de Nitrocelulosa . . . . .	45
2.17.3	Prehibridación del Filtro de Nitrocelulosa . . . . .	45
2.17.4	Marcaje Radioactivo de la Sonda por el Método de Movimiento de la Muesca . . . . .	46
2.17.5	Evaluación del Marcaje de la Sonda por Absorción a Filtros DE-81 . . . . .	47
2.17.6	Purificación de la Sonda Radiactiva . . . . .	48
2.17.7	Hibridación con la Sonda PvuII-PvuII del ADN de bGH . . . . .	49
2.18	Gel de Poliacrilamida-SDS . . . . .	49
2.18.1	Preparación del gel y Electroforesis . . . . .	50
2.18.2	Tinción con Azul de Coomassie. . . . .	50
2.19	Inmunoelectrotransferencia o "Western Blotting" . . . . .	50
2.20	Determinación de la Secuencia Nucleotídica del ADNc de bGH y el Promotor trc . . . . .	53
2.20.1	Preparación de Células Calcio-Competentes de <i>E. Coli</i> , Cepa JM101 y Transformación con el Fago M13 . . . . .	53
2.20.2	Análisis del ADN de Clonas de M13+ Inserto . . . . .	55
2.20.3	Obtención del ADN de Cadena Sencilla del Fago M13 . . . . .	56
2.20.4	Reacción Enzimática de Secuenciación de ADN . . . . .	57
2.20.5	Preparación y Corrimiento del gel de Secuencia . . . . .	59
2.20.6	Secado y Exposición del gel a	

Película de Rayos X . . . . . 61

Capítulo	Página
3. RESULTADOS . . . . .	62
3.1 Caracterización Enzimática del Plásmido pKbGH-N . . . . .	63
3.2 Caracterización Enzimática del Plásmido pKbGH-S . . . . .	63
3.3 Caracterización Enzimática del Plásmido pKhPLhGH22K . . . . .	63
3.4 Extracción de ARNs de Células con y sin Inducción del Promotor trc . . . . .	67
3.5 Electroforesis de los ARNs en gel Agarosa Urea-Acido . . . . .	68
3.6 Detección de ARNs Mensajeros para Hormonas del Crecimiento por el Ensayo Tipo "Northern" . . . . .	68
3.7 Análisis de Proteína . . . . .	71
3.7.1 Por Poliacrilamida-SDS . . . . .	73
3.7.2 Inmunoelectrotransferencia . . . . .	73
3.8 Análisis de la Secuencia Nucleotídica del Inserto de pKbGH-S y el Promotor trc . . . . .	73
4. DISCUSION DE RESULTADOS . . . . .	75
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES . . . . .	77
REFERENCIAS . . . . .	79
APENDICES . . . . .	81
APENDICE A.- CUESTIONARIO DE OPCION MULTIPLE . . . . .	82
APENDICE B.- PROGRAMA DE CAPTURA DE DATOS . . . . .	88

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Concentrado de los Datos de Campo Obtenidos de los Individuos del Tratamiento . . . .	26
II. Datos de Campo del Tratamiento dos Obtenidos en Forma Individual . . . . .	27
III. Datos de Campo del Tratamiento tres Obtenidos en Forma Individual . . . . .	28
IV. Número de Cabras Vacías y Preñadas por Tratamiento . . . . .	29
V. Porcentaje de Cabras Vacías y Preñadas por Tratamiento . . . . .	29
VI. Número de Partos Dobles y Sencillos con Respecto al Número de Cabras Preñadas . . . .	30
VII. Porcentaje de Partos Dobles y Sencillos con Respecto al Número de Cabras Preñadas . . . .	30
VIII. Comparación de los Tratamientos y su Diferencia Estadística, con Respecto a la Sincronización con Ovulación Fértil y su tasa de Nacimientos Múltiples . . . . .	34
IX. Comparación del Costo del Tratamiento Comercial y de los Tratamientos Experimentales por Unidad . . . . .	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Plano de Localización General . . . . .	4
2. Plano de Provincias Fisiográficas . . . . .	7
3. Registros de las Estaciones Meteorológicas de la Zona . . . . .	11
4. Plano de Regiones Hidrológicas . . . . .	13
5. Mapa de Geología Estructural . . . . .	15
6. Plano Geológico . . . . .	18
7. Secciones Esquemáticas de la Sierra Madre Oriental . . . . .	19
8. Columnas Estratigráficas . . . . .	23
9. Planos Geológicos y Topográficos SPP Escala 1:50,000 Usados como base para el Estudio . . . .	33
10. Modelo Geohidrológico del Margen Oriental de la Sierra Madre Oriental . . . . .	36
11. Geología de los Terrenos de la ULUANL . . . . .	38
12. Localización de Pozos en la ULUANL . . . . .	41
13. Pozos Utilizados en el Experimento de Trazado . .	49
14. Espectro de Emisión Fluorescente . . . . .	50
15. Gráficas Tiempo-Concentración para los Pozos 19A y 18A . . . . .	54
16. Gráficas Tiempo-Concentración para los Pozos 14A y 17A . . . . .	55
17. Diagrama Vectorial de Velocidades . . . . .	57

18. Indicaciones para el uso del Método en el Campo	. 62
---	------

# **CAPÍTULO 1**

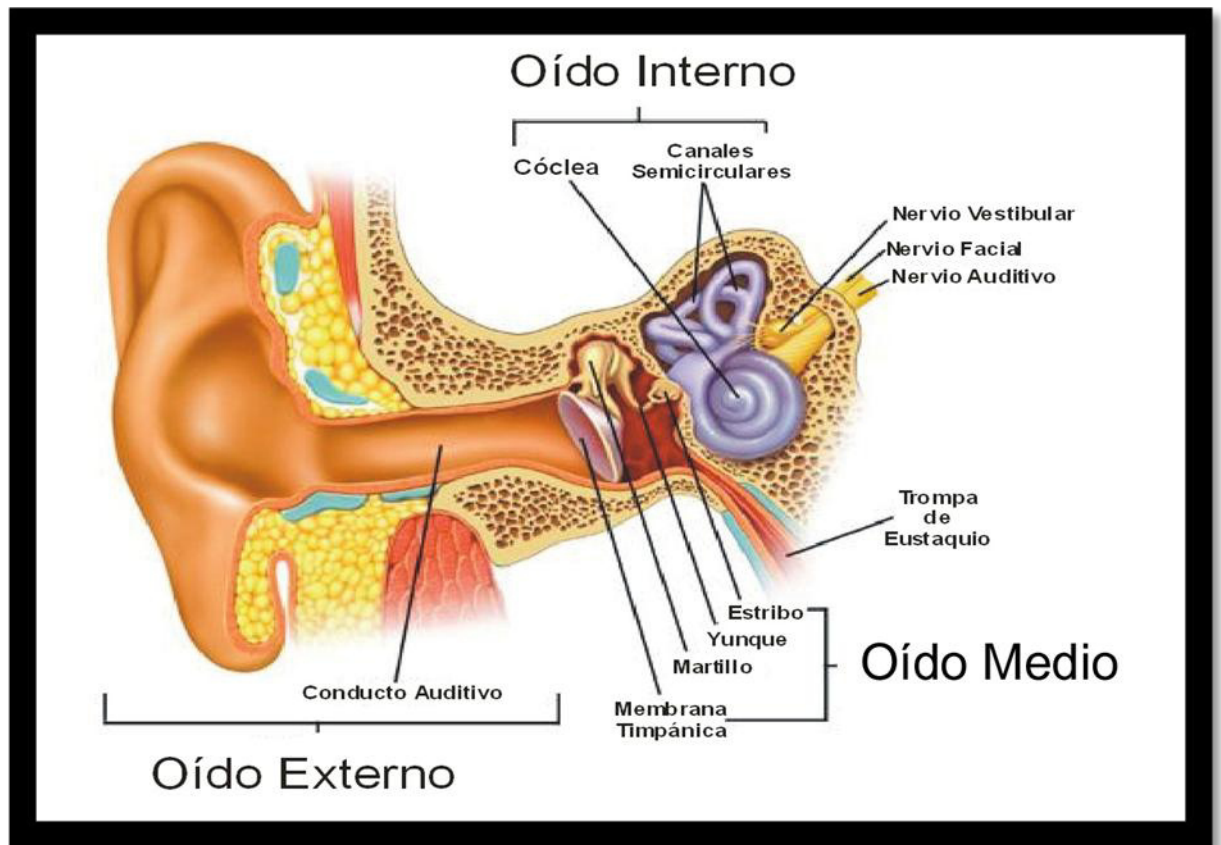
## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 ANTECEDENTES ANATÓMICOS**

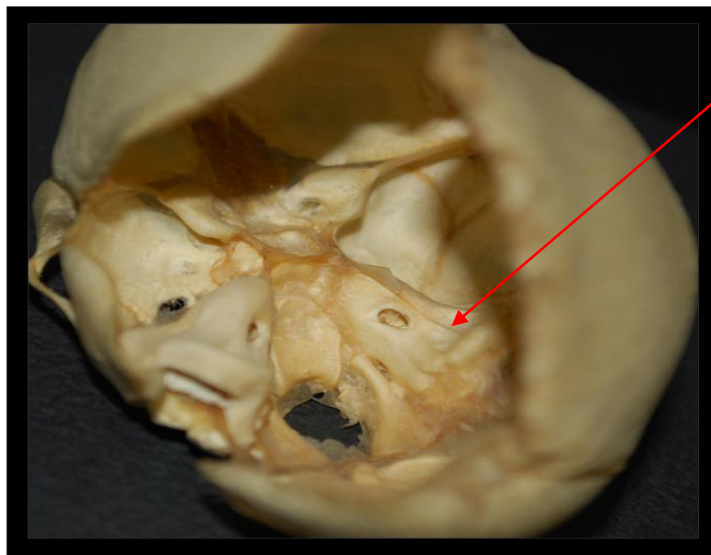
El oído se divide en las porciones externa, media e interna (Figura 1.), sus funciones principales son: la audición y el equilibrio.

El oído externo se compone del pabellón auricular, que recoge el sonido, del canal o conducto auditivo, que conduce el sonido hasta la membrana timpánica. El oído medio inicia con la membrana timpánica seguida de la cavidad timpánica, la cual contiene los huesecillos del oído, martillo, yunque y estribo. El oído interno contiene el órgano vestibulococlear, que se ocupa de la recepción del sonido y del mantenimiento del equilibrio, se encuentra en la porción petrosa del hueso temporal( Figura 2). El oído interno puede dividirse morfológicamente en laberinto óseo y laberinto membranoso. El laberinto óseo es la cápsula ósea que rodea al laberinto membranoso, y éste último consiste en un sistema hueco que contiene a la endolinfa. Entre laberinto óseo y membranoso se encuentra la perilinfa, los dos liquido transportan las ondas sónicas a los órganos terminales para la audición y el equilibrio.(1)





**Figura 1.** Las porciones del oído. Corte coronal y esquemático del oído. El oído consta de tres porciones: externo, medio e interno. El oído externo se compone del pabellón auricular y del conducto auditivo externo. El oído medio inicia con la membrana timpánica y la cavidad timpánica que es un espacio aéreo donde se alojan los huesecillos del oído. El oído interno contiene el laberinto membranoso el cual consta del conducto coclear, utrículo, sáculo y los canales semicirculares.



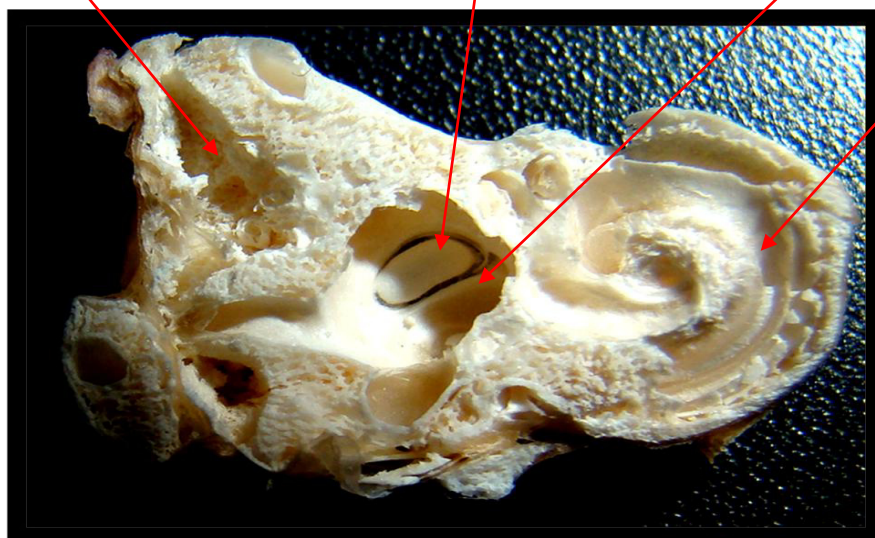
Región petrosa del  
hueso temporal.

**Figura 2.** Craneano de un feto humano de 20 semanas de gestación. Visión superior de la parte interior del cráneo, donde se observa el hueso temporal y el laberinto óseo.

Conducto semicircular óseo

Ventana oval

Platina del estribo



Laberinto óseo

**Figura 3.** Porción petrosa del hueso temporal, de cráneo de un feto humano.  
Visión de las paredes del laberinto óseo (cápsula ótica).

## 1.2 ANTECEDENTES EMBRIOLÓGICOS.

El oído interno es la primera parte en desarrollarse. En el ser humano inicia durante la cuarta semana cuando aparece un engrosamiento del ectodermo, a cada lado del mielencéfalo, que es la parte caudal del romboencéfalo, a este engrosamiento es llamado placoda ótica, esto es debido a señales inductivas procedentes del mesodermo paraaxial y de la notocorda (Figura 4).

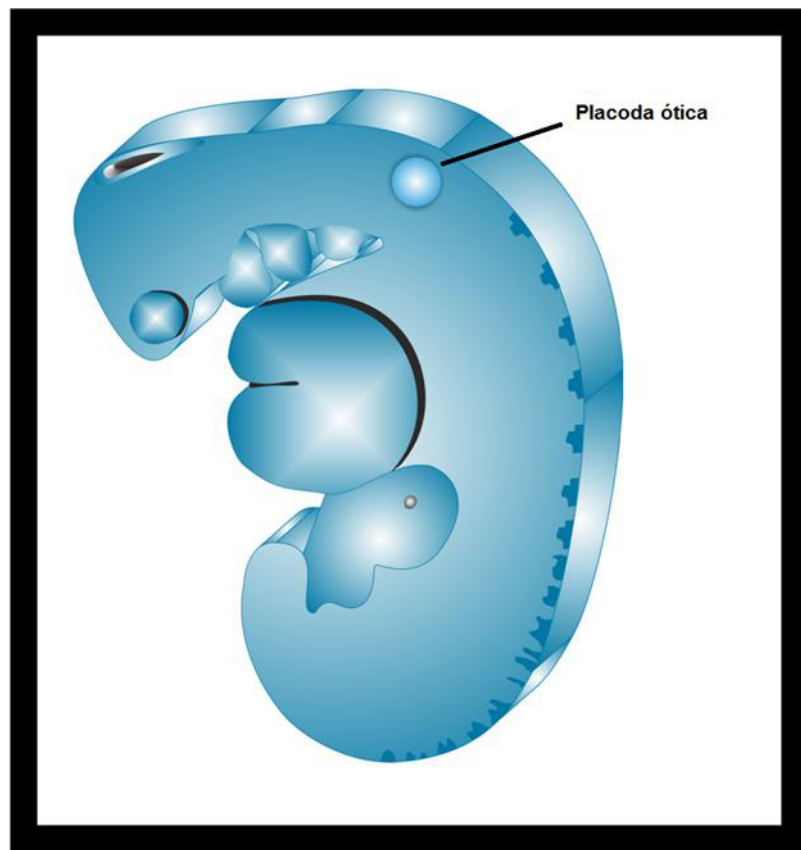


Figura 4. Esquema de un embrión de 4 semanas de gestación. Se observa el engrosamiento superficial del ectodermo en la parte en la parte cefálica del embrión, placoda ótica.

Al poco tiempo cada placoda se invagina, para formar la fóvea o fosita ótica (Figura 5.). Los bordes de las fóveas óticas se aproximan entre sí, para fusionarse y formar una vesícula ótica u otocisto. (Figura 6.)

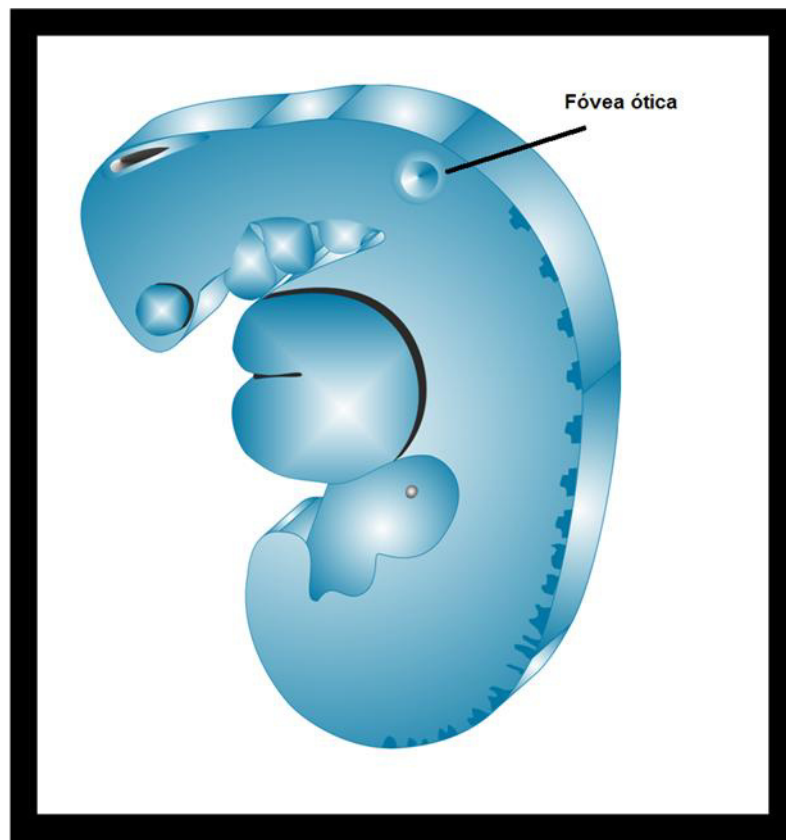
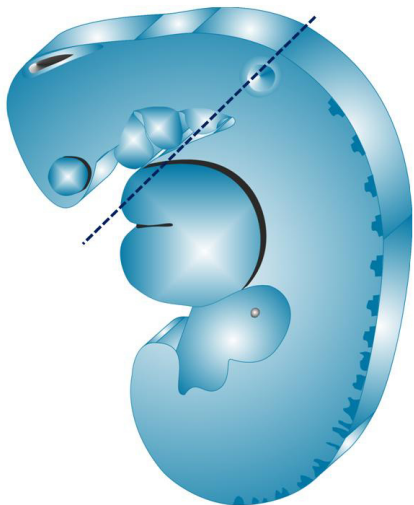
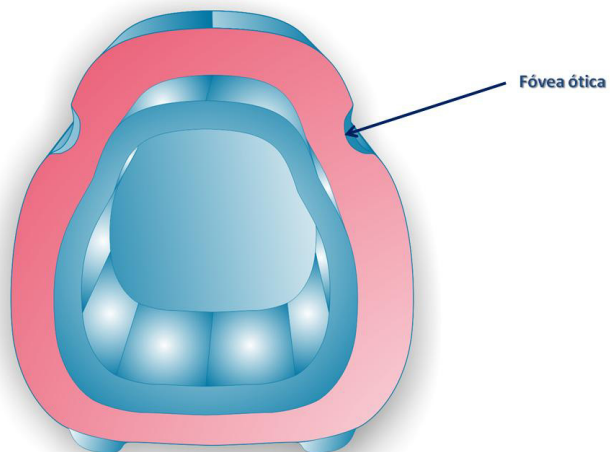


Figura 5. Esquema de un embrión de 4 semanas de gestación. Se observa una invaginación de la placoda ótica, la cual formara la fóvea ótica.

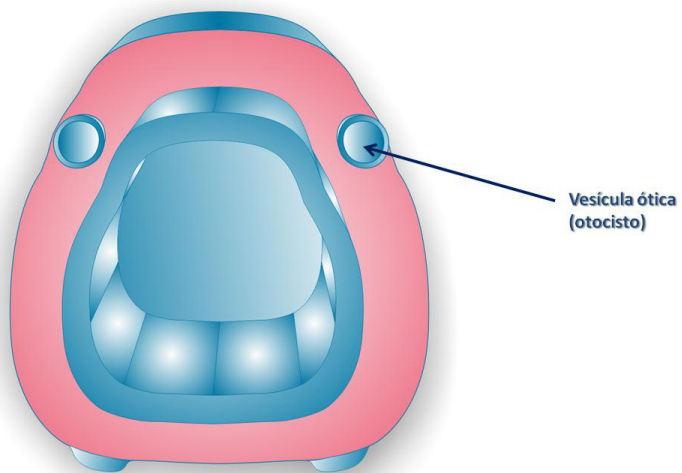
A



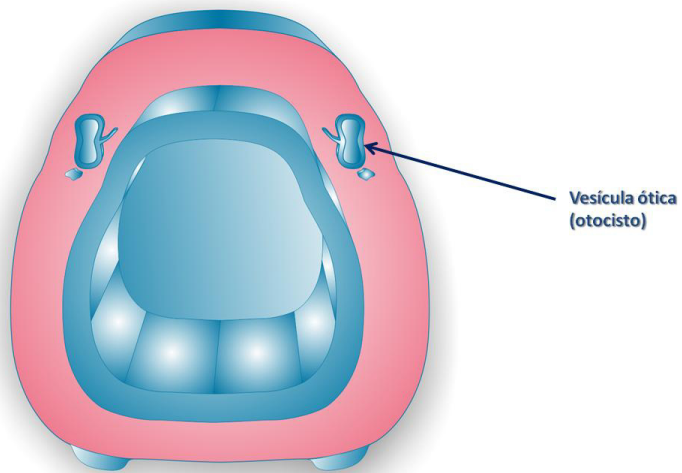
B



C

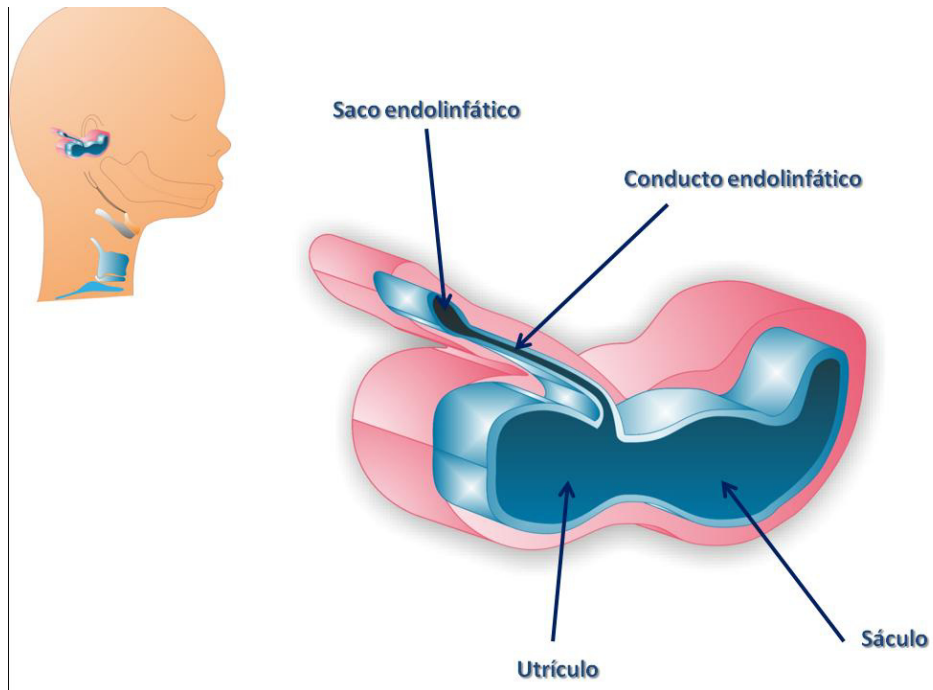


D



**Figura 6.A)** Esquema de un embrión de 4 semanas de gestación. **B)** Corte a través del cerebro posterior y su relación con la fóvea ótica. **C)** y **D)** Formación y diferenciación del otocisto.

Durante el desarrollo posterior la vesícula ótica se divide en : 1) un componente ventral que da origen a él sáculo y a el conducto coclear y 2) un componente dorsal que formara el utrículo, los conductos semicirculares y el conducto endolinfático.

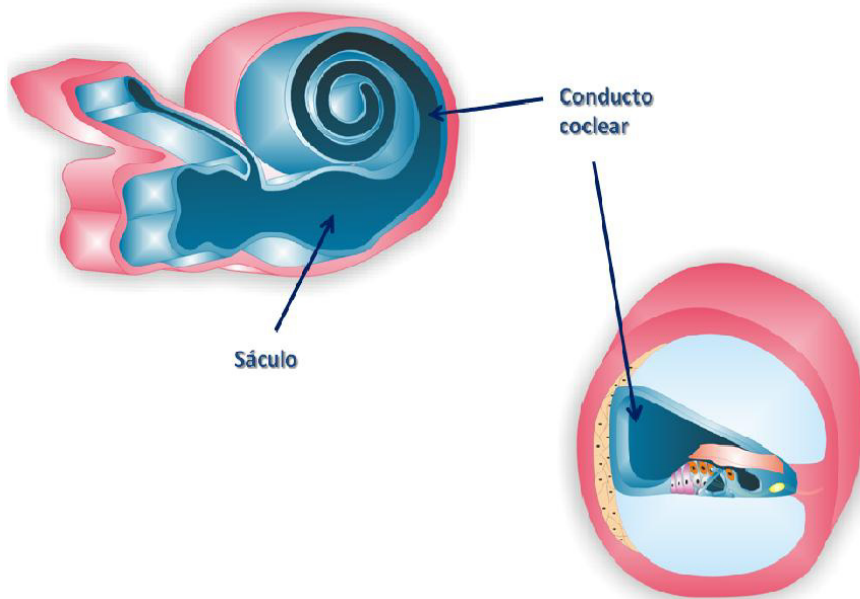


**Figura 7.** Es que muestra la orientación y posición del oído interno.

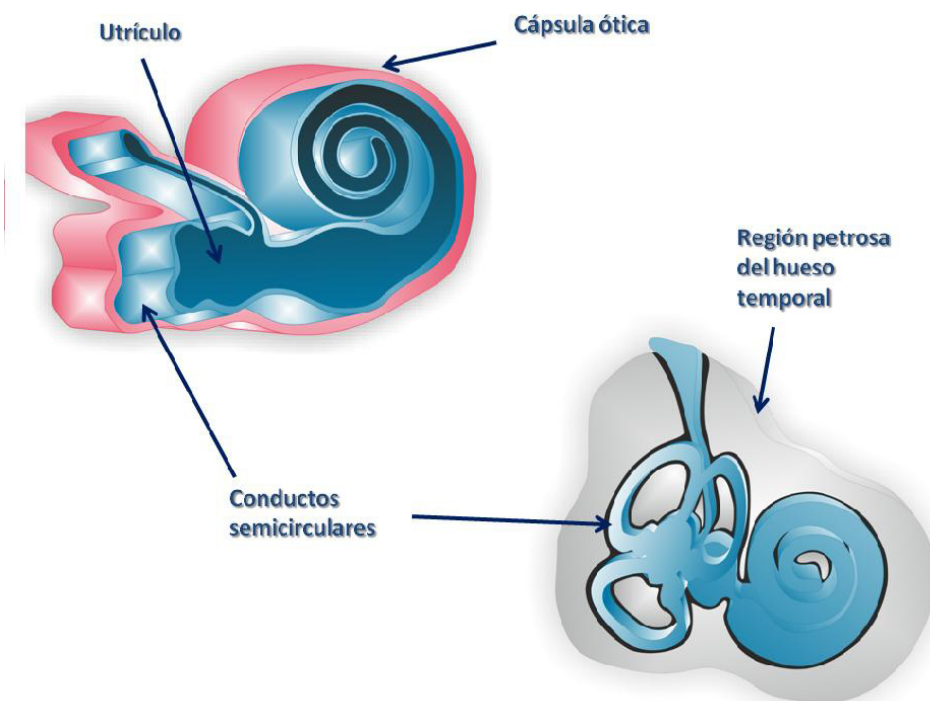
**Figura 8.** Esquema del oído interno, el cual se divide en dos componentes: 1) Componente ventral, que da origen a, el sáculo y a el conducto coclear; 2) Componente dorsal, que origina a el utrículo y los conductos semicirculares. También el esquema muestra como la capsula ótica que rodea el oído interno en un inicio es cartílago, mas adelante en el desarrollo se osifica para formar la región petrosa del hueso temporal



### Componente ventral



### Componente dorsal

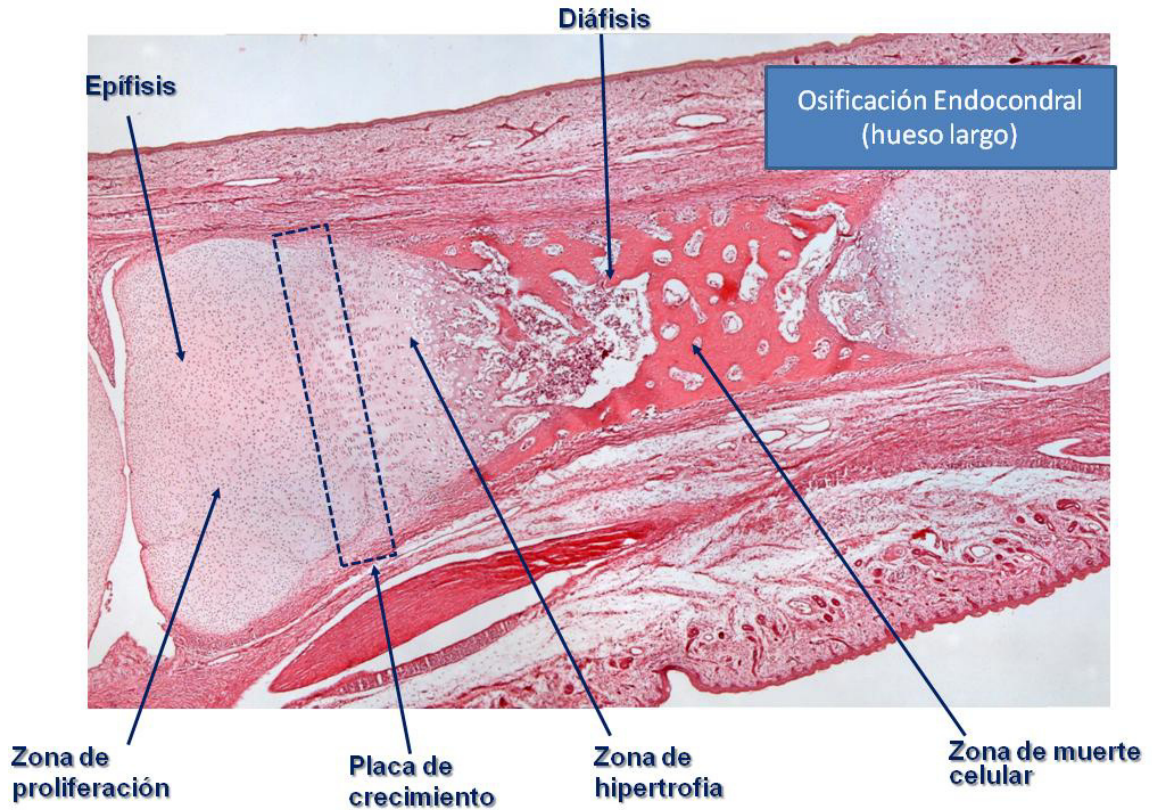




El oído interno tiene una cubierta, que lo aloja y lo protege, es llamada cápsula ótica. Su desarrollo se inicia durante la quinta semana cuando el otocisto es rodeado por células mesenquimales procedentes del mesodermo paraxial y de la cresta neural. En respuesta a señales inductivas del epitelio del otocisto, el mesénquima se condensa y se diferencia en células con capacidad condrogénica; dichas células se convertirán en condrocitos que formarán un molde llamado cápsula ótica cartilaginosa. Mediante el proceso de osificación endocondral la cápsula ótica cartilaginosa se convertirá en la porción petrosa del hueso temporal .

### **1.3 OSIFICACIÓN ENDOCONDRAL**

El modelo más conocido de osificación endocondral es el que se presenta en la placa de crecimiento de los huesos largos; en ella el desarrollo se presenta en fases sucesivas estrictamente reguladas por vías de señales moleculares. El proceso inicia con la proliferación de los condrocitos, los cuales se alinean en columnas y secretan colágeno tipo II y agregano para formar la matriz extracelular. Posteriormente, los condrocitos detienen su ciclo celular y se diferencian; gradualmente se hipertrofian para después mineralizar y modelar la matriz extracelular. En este punto el condrocito muere mediante el proceso de apoptosis, lo cual permite la entrada de vasos sanguíneos, osteoclastos, células precursoras de osteoblastos y de la médula ósea; finalmente el cartílago es remplazado por hueso.(Figura 9)



**Figura 9.** Corte histológico de un hueso largo. Osificación endocondral.

Microscopia de luz. Tinción H y E, 5X.

Otro ejemplo de osificación endocondral ocurre en las sincondrosis de la base de cráneo. Una sincondrosis está compuesta por dos placas de crecimiento que comparten una zona central compuesta por condrocitos de reserva; a partir de ésta, el crecimiento se extiende en direcciones opuestas, como si fueran imágenes en espejo. En las sincondrosis también se ha identificado la presencia de apoptosis de los condrocitos después que éstos han pasado por la fase de hipertrofia.

El desarrollo inicial de la cápsula ótica es similar al de otros huesos con osificación endocondral, sin embargo más tarde en el desarrollo existen diferencias importantes. En otros huesos el cartílago es sustituido completamente por hueso maduro, sin embargo la cápsula ótica no se osifica completamente y es posible observar áreas que permanecen cartilaginosas a lo largo de la vida. Este comportamiento es debido a la formación de estructuras parecidas a canales que se mantiene a lo largo de la vida; los canales se han observado solo en los vertebrados más desarrollados y se encargan de proporcionar vasos sanguíneos y células mesenquimáticas que impiden la osificación en las regiones más profundas del cartílago .

Otra característica notable de la cápsula ótica es que presenta una tasa de recambio óseo casi nula; es decir, para fines prácticos es un hueso que ha perdido la capacidad de remodelarse; las razones son desconocidas, sin embargo se ha sugerido que este comportamiento es un requisito fundamental para la función normal del oído interno ().

#### **1.4 PATOLOGIAS ASOCIADAS**

En patologías como la otoesclerosis, la osteogénesis imperfecta o la enfermedad de Paget, la cápsula ótica presenta focos anormales de remodelación, situación que conduce a la pérdida auditiva del oído afectado (). Interesantemente, en tales patologías se han implicado alteraciones en el proceso de apoptosis dentro de su fisiopatología ().

Además de las enfermedades óseas, el hueso temporal también puede presentar defectos espontáneos en su integridad, entre los que se encuentran: los defectos en la fisura de Hyrtl, el canal de Falopio amplio, la displasia de Mondini, el acueducto coclear patente, los defectos del tegmen timpani y la dehiscencia de los conductos semicirculares (). Todos ellos representan sitios en los cuales existe un defecto óseo, potencialmente atribuible a alteraciones en la apoptosis durante el desarrollo de la cápsula ótica.

### **1.5 APOPTOSIS**

La apoptosis o muerte celular programada es un importante regulador del crecimiento celular y juega un papel crucial en la morfogénesis. En los huesos largos y en las sincondrosis de la base del cráneo, la apoptosis de los condrocitos representa una etapa crítica de su morfogénesis (). Por otra parte, durante la vida postnatal la apoptosis de los osteocitos ha sido señalada como un importante regulador de la remodelación de la superficie del hueso y un determinante crítico de la resistencia ósea ().

Actualmente existe un conocimiento amplio de los patrones de expresión de los genes involucrados en la osificación de los huesos largos y se han dado los primeros pasos en el estudio de las sincondrosis de la base del cráneo; sin embargo la cápsula ótica permanece poco estudiada. Tomando en cuenta que el proceso de osificación de la cápsula ótica es único, es lógico suponer que la distribución espacio temporal del proceso de apoptosis de sus condrocitos sea diferente al observado en los huesos largos o en las sincondrosis de la base del

cráneo. De corroborarse lo anterior, existiría una fuerte sospecha que el patrón de expresión de los genes que gobiernan la osificación de la cápsula ótica también sea diferente y único. Si por el contrario, el patrón de apoptosis es similar al de otros huesos con osificación endocondral, uno esperaría encontrar una secuencia parecida, si no idéntica, de los genes esqueletogénicos ya conocidos.

## **1.6 Justificación**

Actualmente, no existen trabajos reportados que evalúen la apoptosis en la cápsula ótica en un modelo murino. Por lo cual el presente trabajo tiene el propósito de ayudar a entender su morfogénesis de la cápsula ótica, proporcionar un modelo a partir del cual se puedan diseñar estudios con marcadores óseos, así como identificar una posible correlación con patologías del hueso temporal.

## **1.7 OBJETIVO GENERAL**

Analizar la distribución espacio temporal del proceso de apoptosis de la cápsula ótica, así como su morfología, en productos de rata en diferentes edades pre-natales y post-natales, mediante microscopia de luz.

## **1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener los productos de las diferentes edades a estudiar.
2. Localizar e identificar la cápsula ótica del hemicráneo izquierdo por medio de cortes histológicos seriados, para evaluarse por microscopia de luz.
3. Observar y analizar la morfogénesis de la cápsula ótica de rata en diferentes edades.
4. Evaluar por microscopia de luz la presencia de apoptosis en las células de la cápsula ótica.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1 MATERIAL.**

##### **2.1.1 Material biológico.**

En este estudio se analizaron productos de rata Sprague Dawley, de distintas edades, especímenes íntegros y con características externas normales, serán divididos en dos grupos, el grupo prenatal de 12, 18 y 21 días de gestación, (R 12 dg, R 18 dg, R 21 dg), y el grupo postnatal compuesto por productos de 6, 12 y 16 días de nacido ( R 6dpp, R 12dpp, R 16dpp) . Proporcionados por el Bioterio del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la U.AN.L.

### **2.1.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

**Criterios de inclusión.** Productos de ratas Sprague Dawley de ambos géneros con las siguientes edades: R 12 dg, R 18 dg, R 21 dg, R 6dpp, R 12dpp, R 16dpp; especímenes íntegros y con características externas normales.

**Criterios de exclusión.** Productos de ratas Sprague Dawley con malformaciones externas; con signos de maceración, incompletos o con alteraciones posicionales.

**Criterios de eliminación.** Productos de ratas Sprague Dawley que una vez preparados no fuera posible analizar debido a defectos de la técnica de preparación.



### **2.1.3 Equipo de laboratorio**

Afilador de cuchillas. Autossharp 5, Thermo Shandon.

Agitador magnético. Hot Pate Stirres, Corning.

Balanza analítica Sartorius BL 120S.

Balanza granataria eléctrica 1206 MP Sartorius.

Baño de flotación. Ligthed Tissue Flotation Bath.

Centro de inclusión. TSB.

Cajas de vidrio para coloración.

Cámara fotográfica. Nikon DX

Equipo de microcirugía: pinzas con punta de 0.5mm, pinzas dumont y tijeras.

Estufa. Lab Line, Instruments, Inc.

Estereomicroscopio Stemi 2000-C con camara AxioCam| Cc1, Carl Zeiss.

Estereomicroscopio Stemi DV4, Carl Zeiss.

Incubadora gravity Convection Incubator, economy model 2EG

Microscopio de Luz. Axiostar plus con cámara AxioCam MRc, Carl Zeiss.

Microscopio de Luz. Primo Star, Carl Zeiss.

Microtomo. HM 315, Microm.

Potenciómetro. pH-Meter, Schott.

Software Axiovision Release 4.8.1.

#### **2.1.4 Reactivos**

Acido acético glacial

Acido clorhídrico

Acido fosfomolibdico

Acido fosfotúngstico

Acido nítrico

Acido pícrico

Agua destilada

Alcohol etílico absoluto

Alcohol etílico en diferentes concentraciones

Cloruro férrico

Eosina G

Escarlata de biebrich

Floxina

Fucsina ácida

Formaldehído

Glicerina

Grenetina

Hematoxilina

Hidróxido de amonio

Hidróxido de sodio

Thymol

Tolueno

Verde brillante

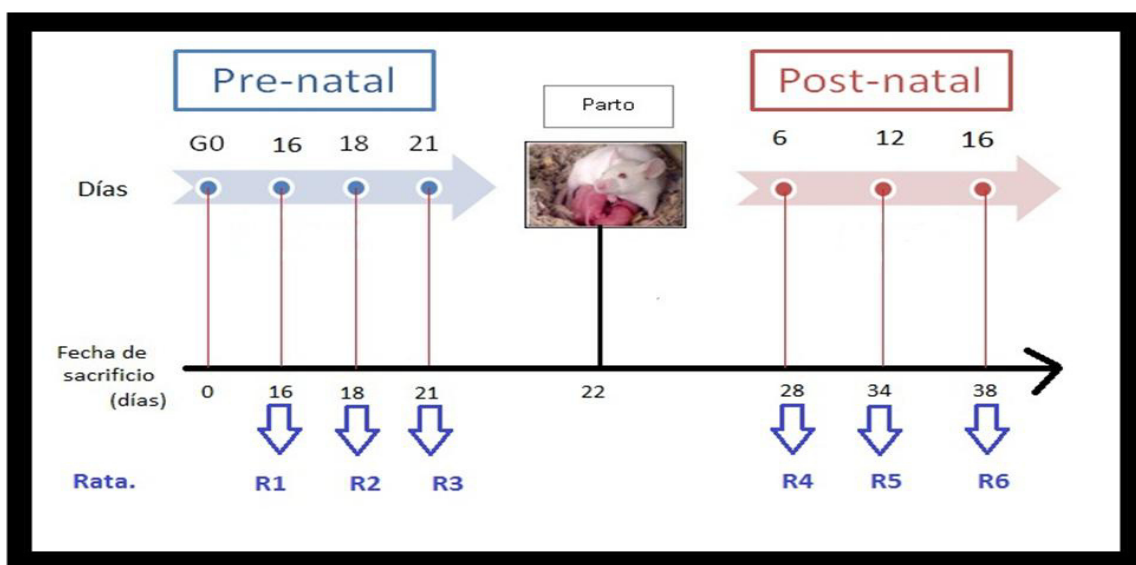
Xilol

Parafina

## 2.2 MÉTODO

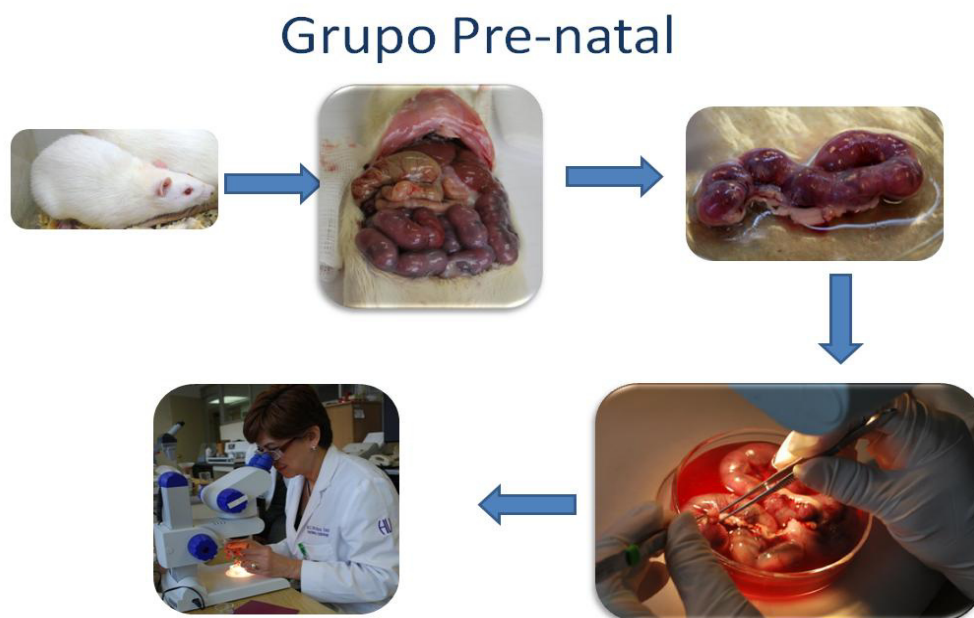
### 2.2.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se seleccionaron 6 ratas hembras Sprague-Dawley adultas jóvenes de 2 meses de edad, con un peso de 200- 224 g, provenientes de Harlan Laboratories S.A. de CV . manteniendo una dieta ad libitum de agua y de alimento Harlan Formula 2018, en un ambiente controlado de temperatura de 18°- 22° y humedad del 70%, con períodos de luz- oscuridad de 12/12 horas, contenidas en jaulas de policarbonato con tapa de acero inoxidable y cama de viruta de madera. Se revisaron diariamente sus ciclos sexuales mediante toma de muestras para citología vaginales. Las ratas fueron apareadas en la etapa de estro del ciclo sexual, por un periodo de dos horas, tomando ese día como día cero de la gestación(G0). Se pesaron semanalmente y se sacrificaron con respecto a las edades ya especificadas( Figura 10).

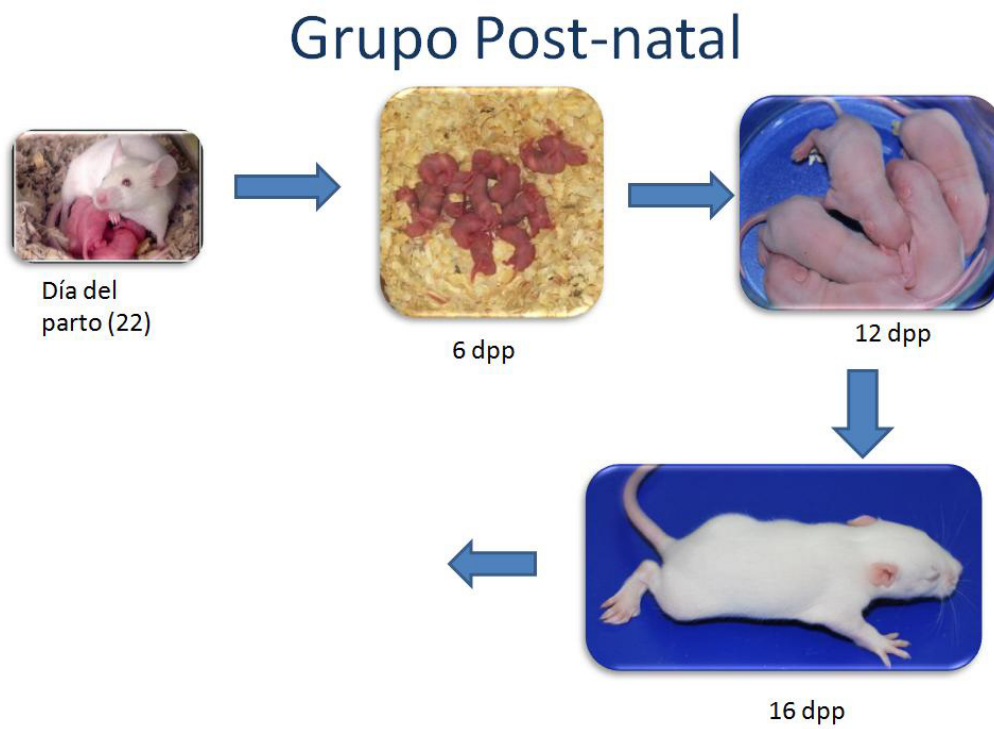


**Figura 10.** Grupos de edades.

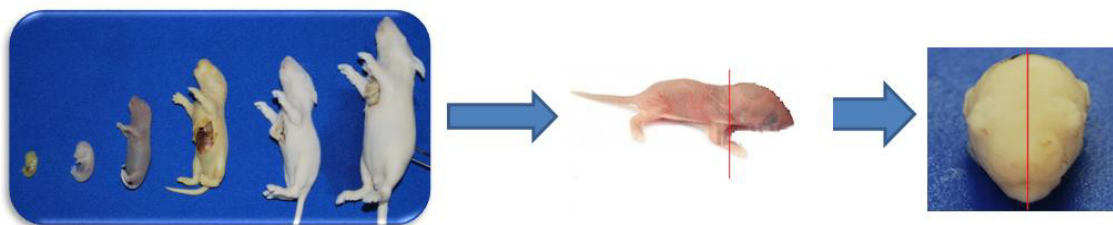
El método de eutanasia para cada rata madre fue por inhalación de éter, las ratas son colocadas en una cámara con éter, para después realizar una disección abdominal exponiendo el útero para la extracción de las crías( Figura 11) . El método de eutanasia para las crías fue de igual manera por inhalación de éter, una vez anestesiado el producto se colocó en posición decúbito supino, se fijaron por perfusión en el ventrículo izquierdo y por inmersión en formaldehído o mangol. Se seleccionaron los productos para cada edad, después se realizó el primer corte a nivel cervical, para obtener la cabeza a la cual posteriormente se realizó un segundo corte sagital, con excepción de la edad de 16 días de gestación debido a su tamaño , obteniendo los dos hemicráneos derecho e izquierdo. Se seleccionaron los hemicráneos izquierdos para la realización de la técnica histológica.( Figuras 12 y 13)



**Figura 11.** Obtención del grupo pre-natal.



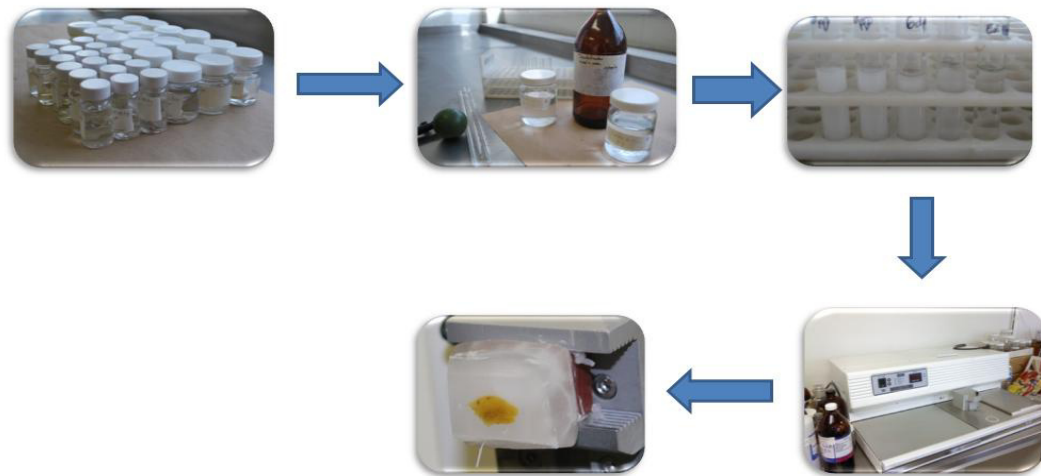
**Figura 12.** Obtención del grupo post-natal.



**Figura 13.** Obtención del hemicráneo izquierdo..

### 2.2.2 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Todas las piezas obtenidas ya fijadas, se continuaron con el proceso de descalcificación descrito en el apéndice A.1 ( Figura 14), seguido de la técnica histológica convencional para muestras embebidas en parafina, descrita en el apéndice A.2 (Figura 15).



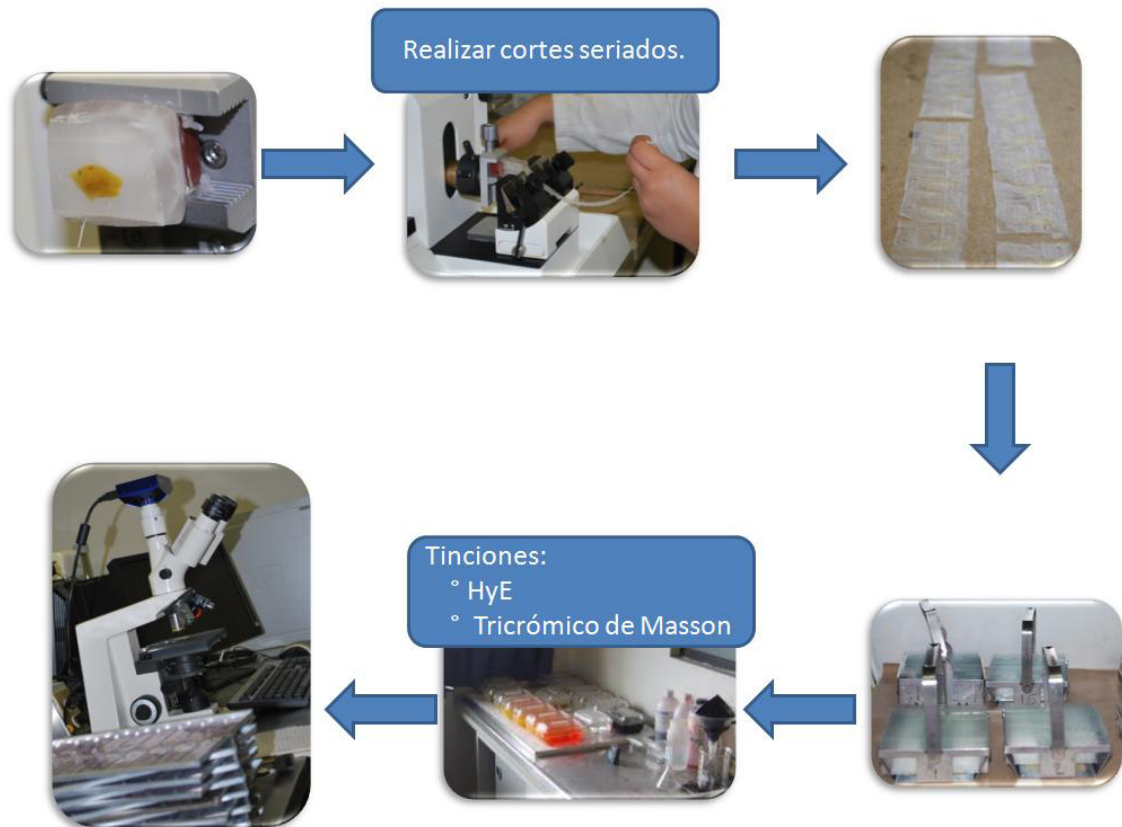
**Figura14.** Técnica de descalcificación

### 2.2.3 ANALISIS MORFOLÓGICO

#### 2.2.3.1 TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA( H Y E ) Y TRICRÓMICO DE MASSON.

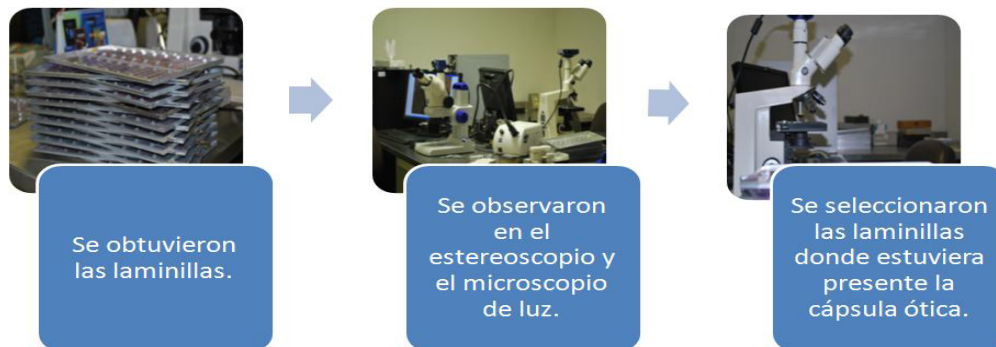
Se realizaron cortes histológico seriados de 10µm de espesor, orientados frontalmente. Las laminillas fueron teñidas con HyE o con Tricrómico de

Masson. Estas técnicas se describen ampliamente en el apéndice A.3 y A.4. Después fueron evaluadas mediante microscopia de luz con los objetivos de 5X y 40X.(Figura 16)



**Figura15.** Técnica de histológica.





**Figura 16.** Evaluación mediante microscopia de luz y estereomicroscopio.

#### **2.2.3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA, PRUEBA DE TUNEL.**

Se realizaron cortes histológicos de 7 $\mu$ m de espesor en sentido frontal. Se realizó la prueba de TUNEL utilizando el kit para detección de apoptosis de Trevigen TACS.XL DAB. Técnica descrita ampliamente en el apéndice A.3.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 ANALISIS MORFOLÓGICO**

Se observaron y analizaron las laminillas obtenidas de los dos grupos: prenatales de 16, 18 y 21 días de gestación y del grupo post-natal, de 6, 12 y 16 días después del parto, estos fueron observados por microscopia de luz y esteromicroscopia.

##### **3.1.1 GRUPO PRE- NATAL**

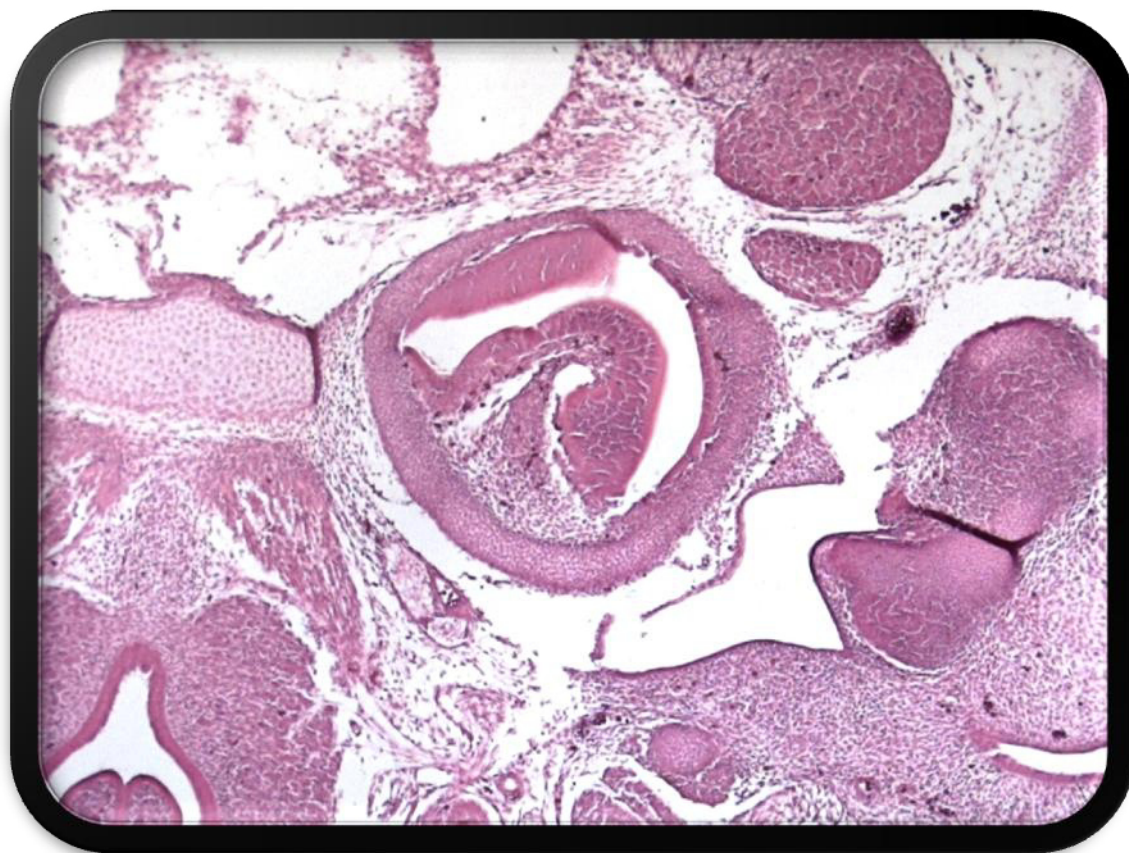
###### **3.1.1.1 RATA DE 16 DIAS DE GESTACIÓN**

En esta etapa del desarrollo fue posible observar el laberinto membranoso en desarrollo rodeado por tejido cartilaginoso que corresponde a la cápsula ótica( Figura 17).

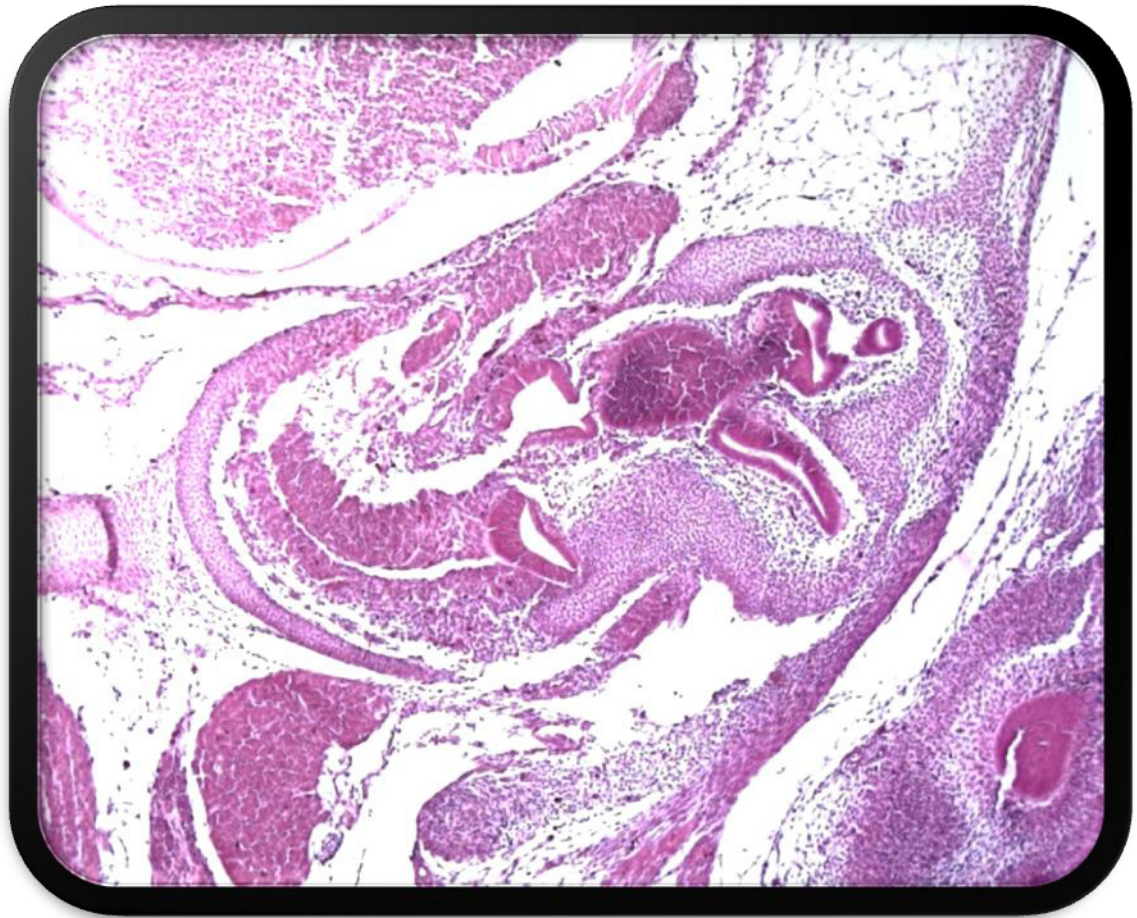


**Figura17.** Corte frontal de cara de rata de 16 días de gestación. Tinción HyE.

Estereomicroscopio 2X.



**Figura18.** Corte frontal de cara de rata de 16 días de gestación. Se observa el conducto coclear que es la parte ventral, rodeado de un conglomerado de células condroblásticas, la cápsula ótica cartilaginosa(CO), también se observan células con actividad condrogénica menos inmaduras que las de la CO, esa estructura es la base del cráneo(BC); plantilla cartilaginosa de los que serán los futuros huesecillos del oído medio (H). Tinción HyE. Microscopia de luz 5X.

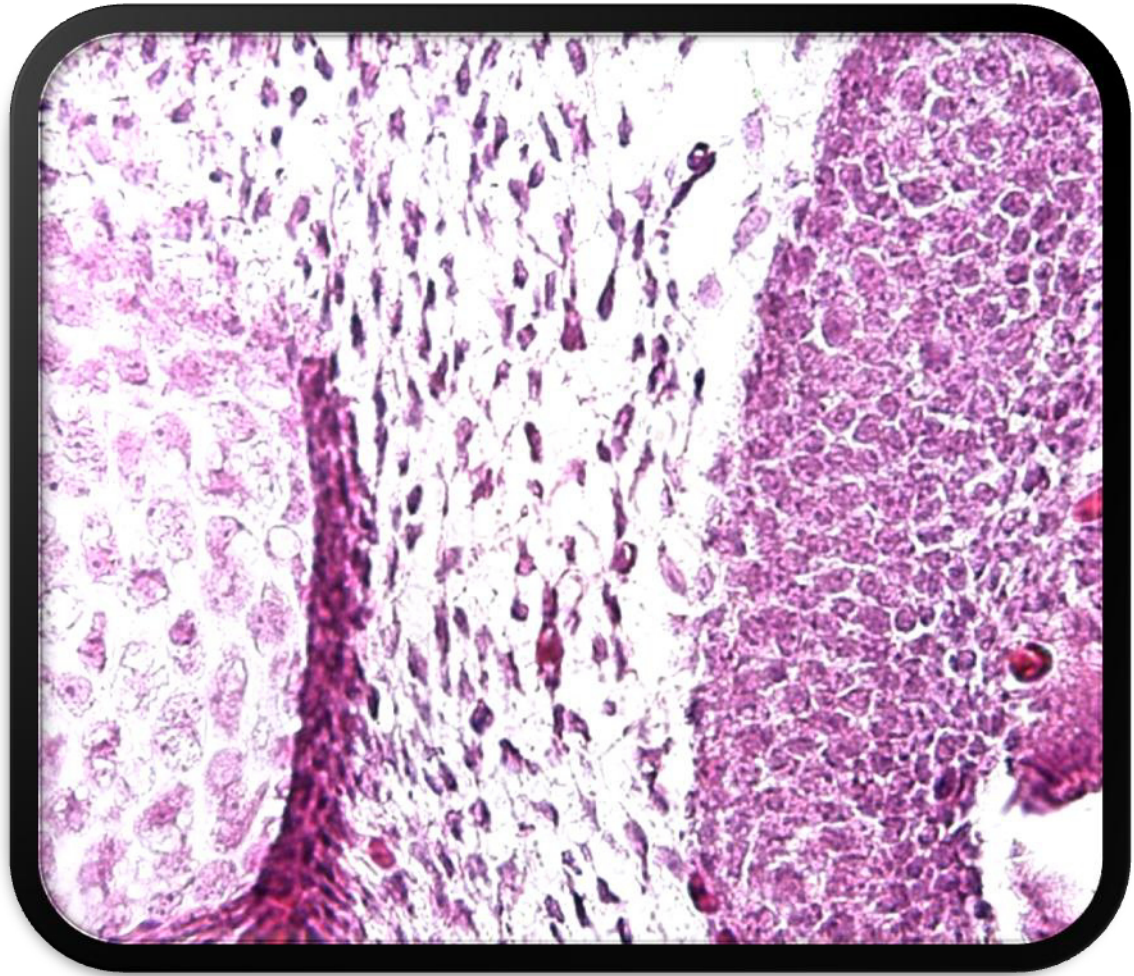


**Figura19.** Corte frontal de cara de rata de 16 días de gestación. Se observa la terminación del conducto coclear, el inicio de la parte sacular y utricular, rodeada de la cápsula ótica cartilaginosa, esta capsula formada por células inmaduras llamadas condroblastos. Tinción HyE. Microscopia de luz 5X.





**Figura 20.** Corte frontal de cara de rata de 16 días de gestación. Se observan parte de los conductos semicirculares que estos se encuentran dorsalmente, rodeada de la cápsula ótica cartilaginosa, esta capsula formada por células inmaduras llamadas condroblastos. Tinción HyE. Microscopia de luz 5X.

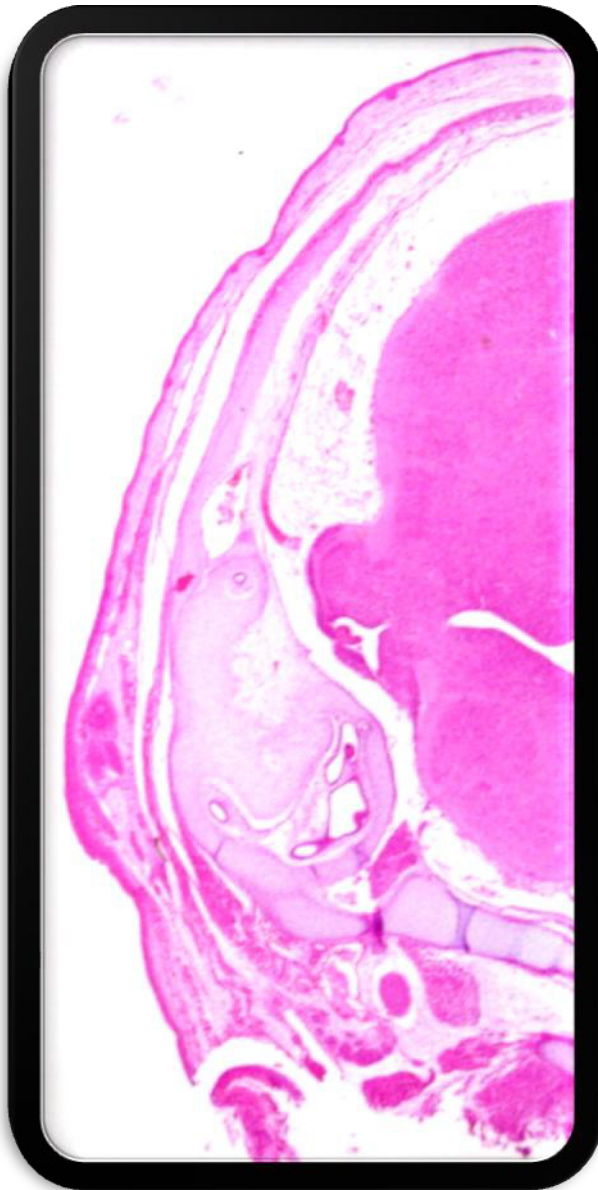


**Figura 21.** Se observa conglomerado de células de forma ovala, irregulares, con su núcleo también de forma oval y el nucléolo prominente basófilos, el citoplasma de estas células se observa heterogéneo de aspecto también basófilo, esto debido a que estas células se encuentran en una alta actividad de síntesis de proteínas, por lo cual presenta gran cantidad de organelos en su interior, RER, abundantes mitocondrias y gran cantidad de vesículas secretorias, llamadas células condroblásticas o condroblastos (CO); células de forma estrelladas con núcleos ovals de aspecto basófilo, son células mesenquimales (CM); células con actividad condrogénica, pertenecientes a la base del cráneo( BC). Tinción HyE. Microscopia de luz 40X.



### 3.1.1.2 RATA DE 18 DIAS DE GESTACIÓN

Se realizaron los cortes seriados de los productos de rata de 18 días de gestación (R18dg), se observaron a microscopio de luz y por estéreo microscopio.



**Figura 22.** Corte frontal del hemicráneo izquierdo de rata de 18 días de gestación. Se observa una sección del oído interno en desarrollo rodeado de la cápsula ótica cartilaginosa. Tinción HyE. Estereomicroscopio 1.25X.



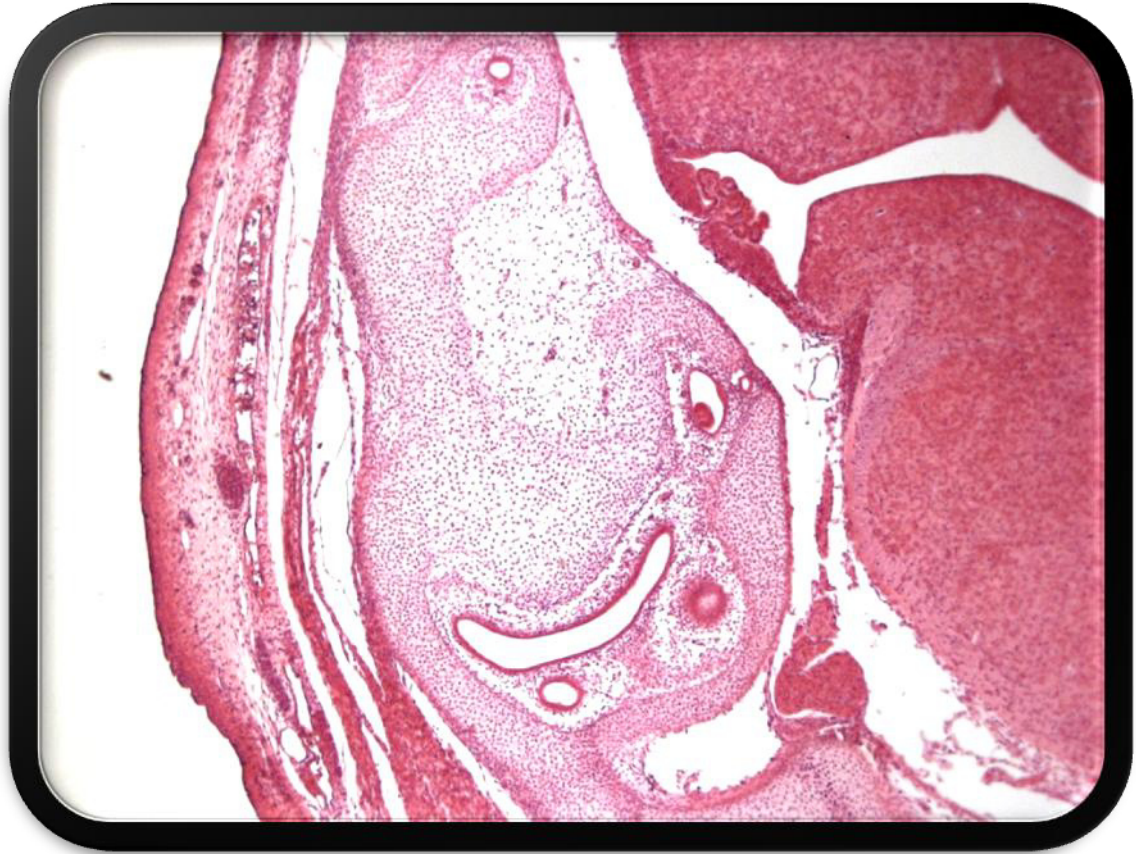


**Figura 23.** Corte frontal del hemicráneo izquierdo de rata de 18 días de gestación. Se observa una sección del oído interno en desarrollo el cual corresponde a la parte ventral que es el inicio del conducto coclear, rodeado de la cápsula ótica cartilaginosa, esta se observa con una mejor organización celular. También se observan los moldes de cartílago de lo que serán los huesecillos del oído medio. Tinción HyE. Microscopia de luz 5X.

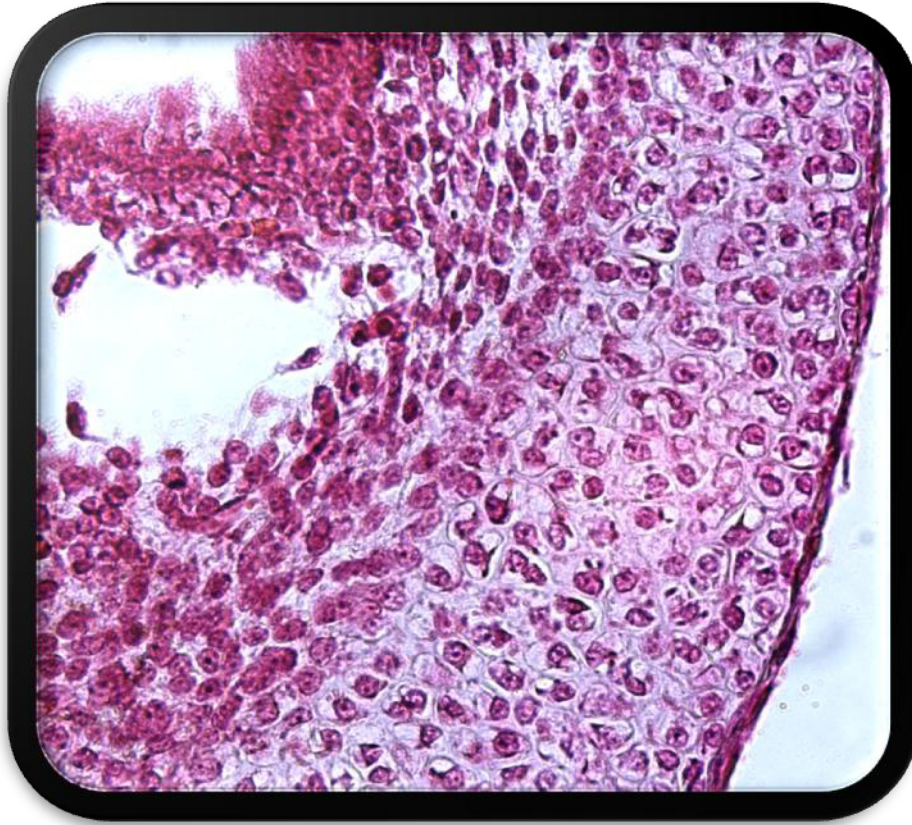


**Figura 24.** Corte frontal del hemicráneo izquierdo de rata de 18 días de gestación. Se observa una sección del oído interno en desarrollo el cual corresponde a la parte final del conducto coclear y la parte del utrículo, rodeado de la cápsula ótica cartilaginosa, esta se observa con una mejor organización celular. Tinción HyE. Microscopia de luz 5X.





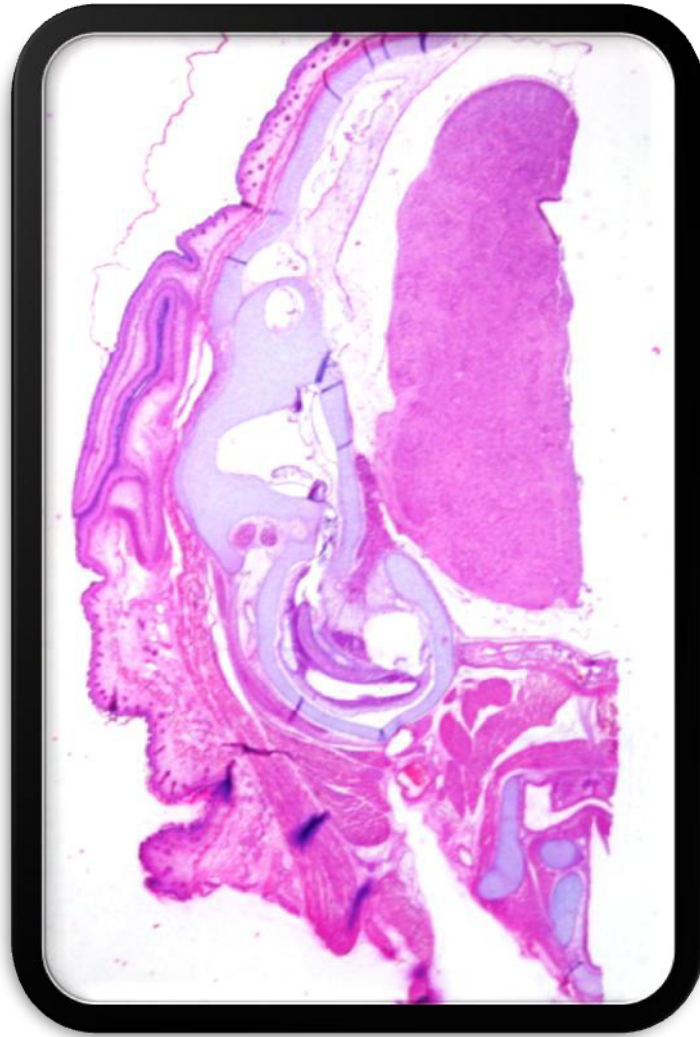
**Figura 25.** Corte frontal del hemicráneo izquierdo de rata de 18 días de gestación. Se observa una sección del oído interno el cual corresponde a la parte dorsal del órgano, que son los conductos semicirculares, rodeado de la cápsula ótica cartilaginosa, se observan sus células de una manera más laxa en su organización. Tinción HyE. Microscopia de luz 5X.



**Figura 26.** Corte del hemicráneo izquierdo rata de 18 días de gestación, acercamiento de una parte del conducto coclear. Se observa células de forma redonda algo irregulares, con su núcleo grande y activo, también se observa un nucléolo prominente basófilos, el citoplasma se observa escaso, estas células se encuentran en una etapa inicial de condrocito se observan ya alguno inmersos en sus lagunas, o intermedia entre condroblastos y condrocitos (CO); también se observan células redondas con núcleos redondo, central, de aspecto basófilo con citoplasma acidofilo, parte del lo que va ser la parte membranosa del oído interno,. Tinción HyE. Microscopia de luz 40X.

### 3.1.1.3 RATA DE 21 DIAS DE GESTACIÓN

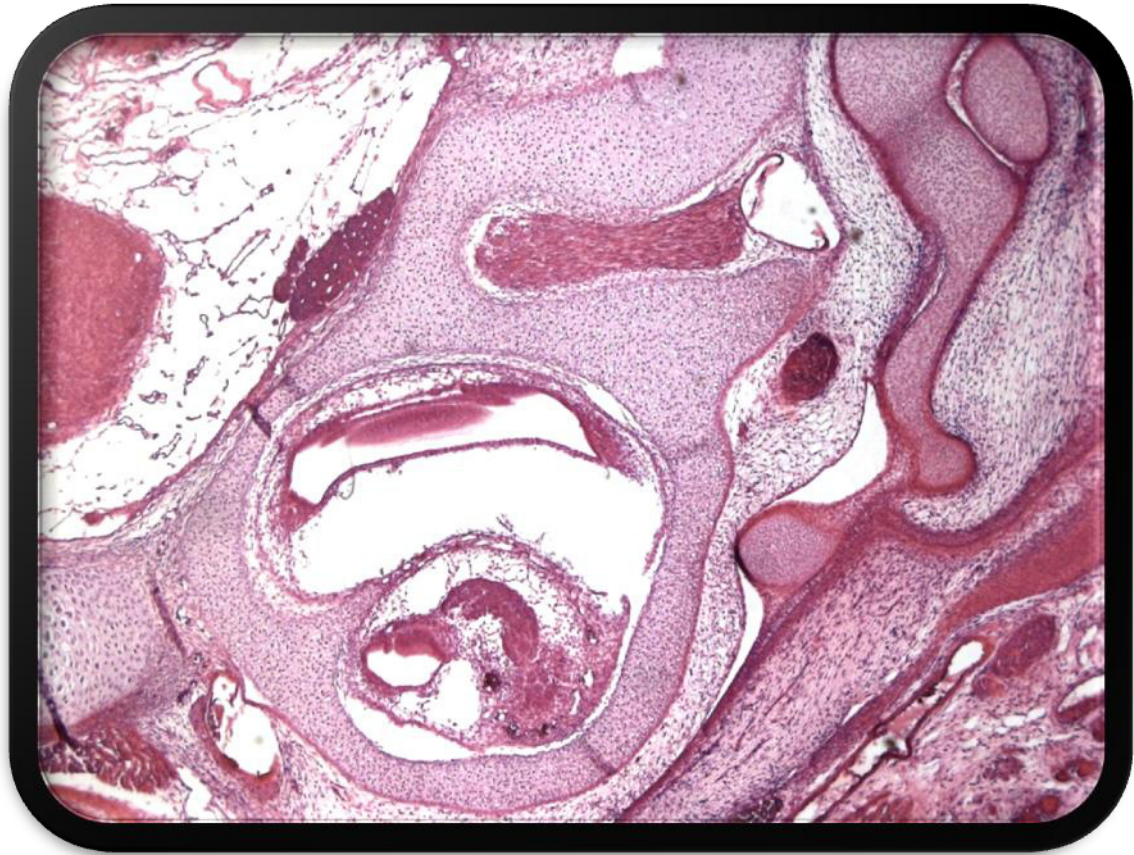
Se realizaron los cortes seriados de los productos de rata de 21 días de gestación (R21dg), se observaron a microscopio de luz y por estéreo microscopio.



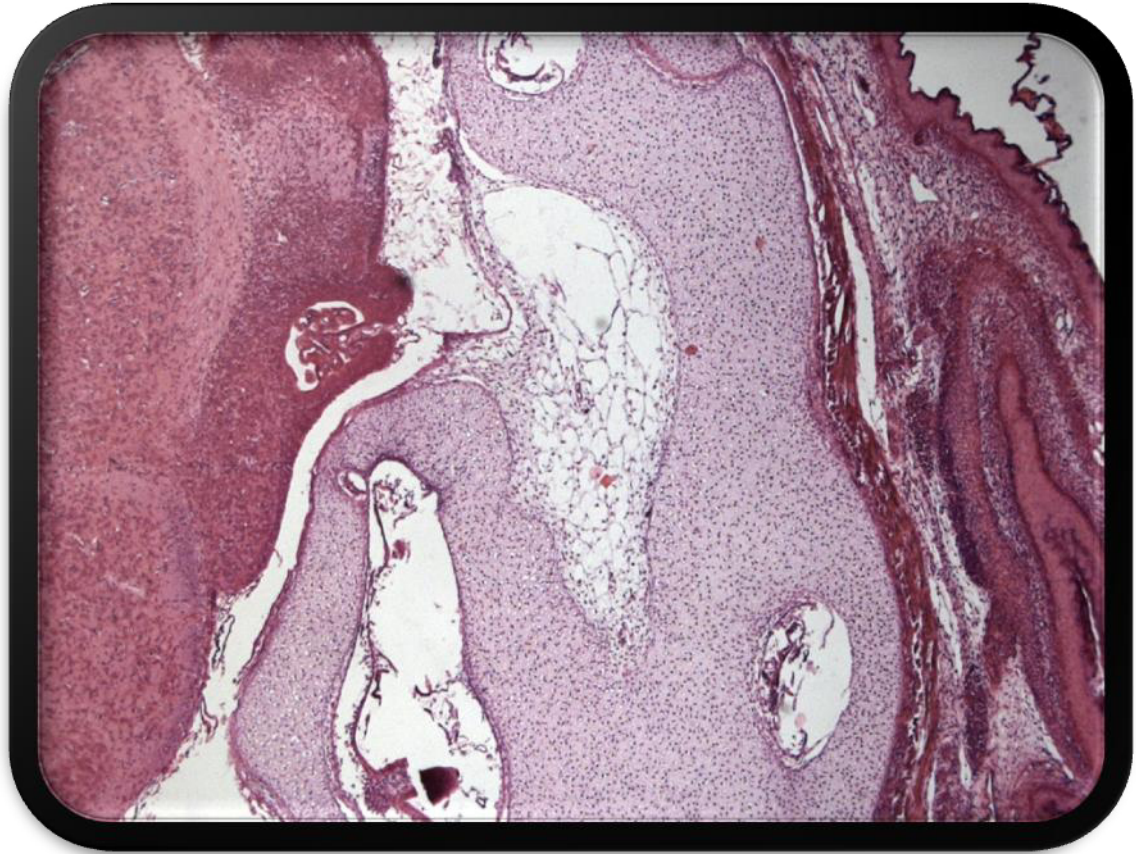
**Figura 27.** Corte frontal del hemicráneo izquierdo de rata de 21 días de gestación. Se observa una sección del oído interno la cual corresponde a la parte final del conducto coclear e inicio de la parte utricular, en desarrollo rodeado de la cápsula ótica cartilaginosa. Tinción HyE. Estereomicroscopio

1.25X.



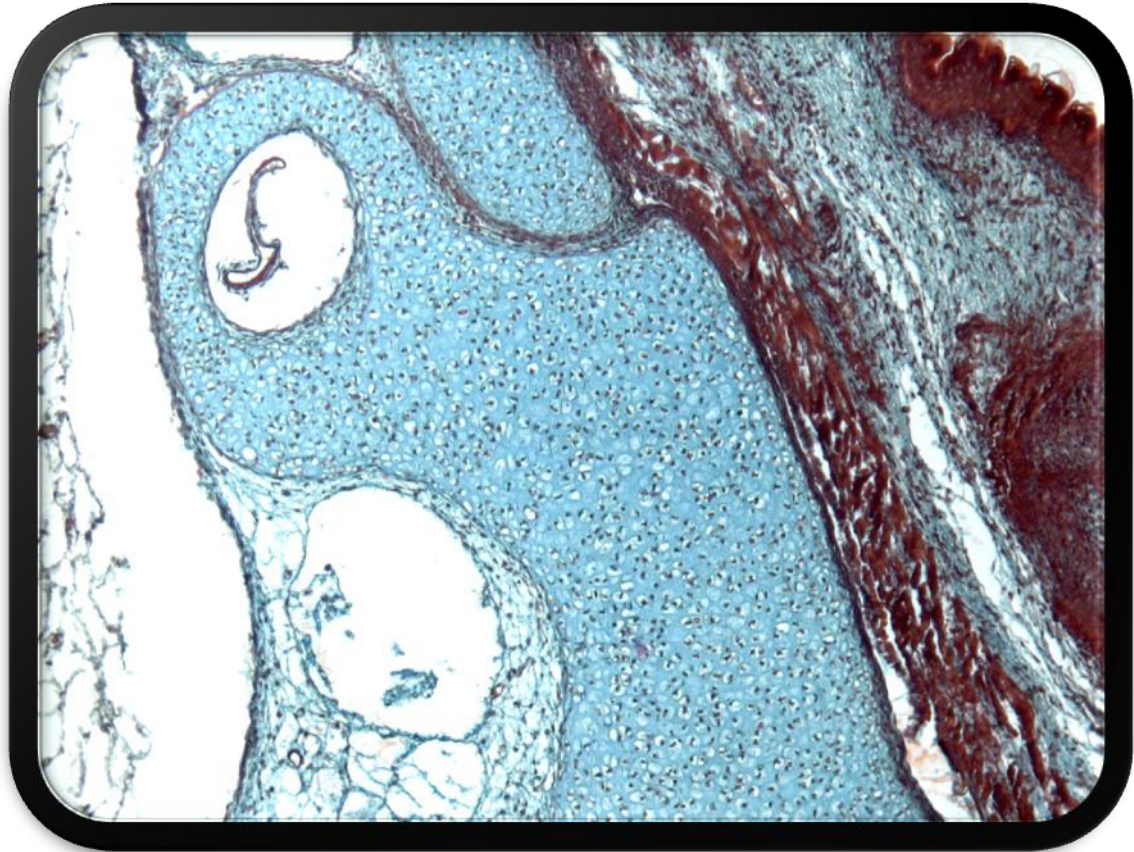


**Figura 28.** Corte frontal del hemicráneo izquierdo de rata de 18 días de gestación. Se observa una sección del oído interno en desarrollo el cual corresponde a el conducto coclear, rodeado de la cápsula ótica cartilaginosa, esta se observa con una mejor organización celular que las edades anteriores. También se observan los moldes de cartílago de lo que serán los huesecillos del oído medio, y una parte de la base del cráneo, la cual se presentan condrocitos pero en una etapa más adelante que los condrocitos de la capsula ótica. Tinción HyE. Microscopia de luz 5X.



**Figura 29.** Corte frontal del hemicráneo izquierdo de rata de 21 días de gestación. Se observa una sección del oído interno el cual corresponde a la parte dorsal del órgano, que son los conductos semicirculares, rodeado de la cápsula ótica cartilaginosa. Tinción HyE. Microscopia de luz 5X.

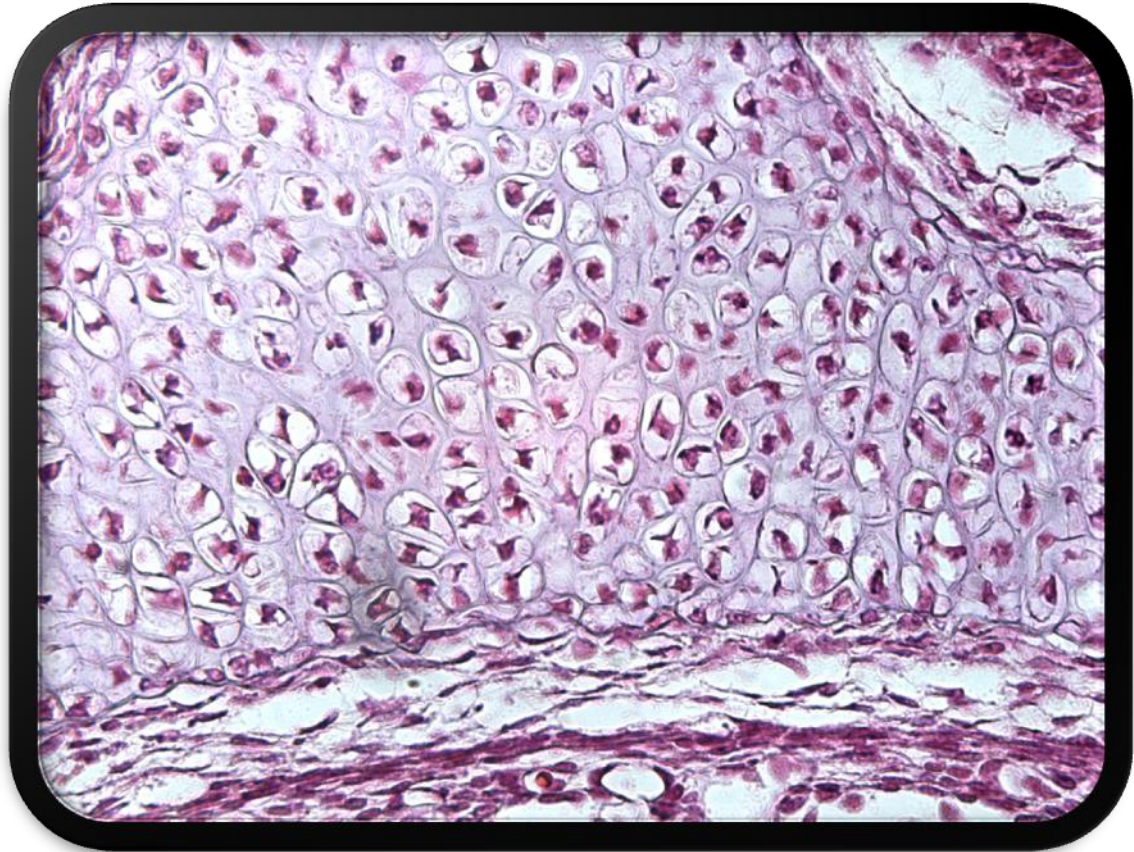




**Figura 30.** Corte frontal del hemicráneo izquierdo de rata de 21 días de gestación. Se observa una sección del oído interno el cual corresponde a la parte dorsal del órgano, que son los conductos semicirculares, rodeado de la cápsula ótica cartilaginosa, con esta tinción se observan mejor los condrocitos inmersos en sus lagunas con su núcleo redondo tenido de rojo.. Tinción

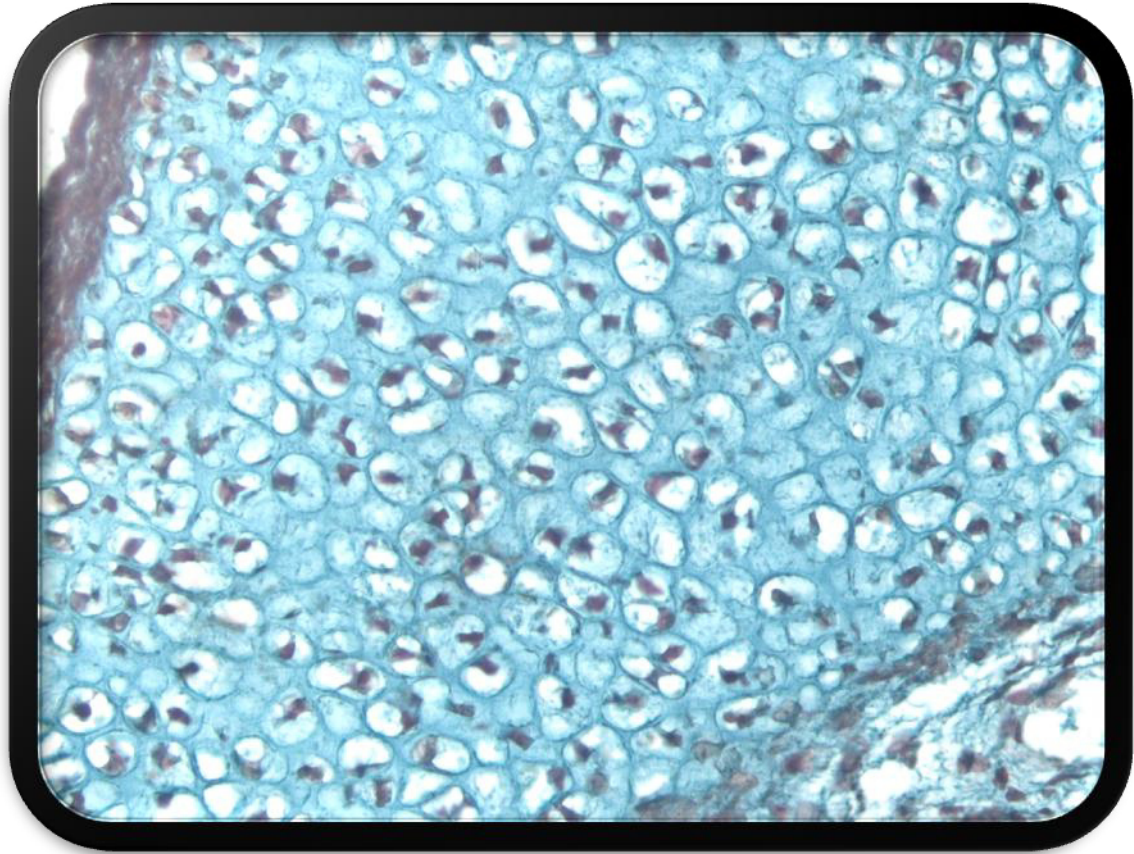
Tricrómico de Masson. Microscopia de luz 5X.





**Figura 31.** Corte del hemicráneo izquierdo rata de 21 días de gestación, acercamiento de una parte del conducto coclear. Se observa células irregulares con prolongaciones, con su núcleo redondo, de aspecto basófilo, el citoplasma se observa escaso, estas células se encuentran inmersas en lagunas, la técnica histológica hace que la célula se encoja y deforme y a microscopia de luz se pueden apreciar los condrocitos en lagunas que es el área blanca y en el interior el condrocito, rodeados de matriz, que ellos mismos secretan (CO);.

Tinción HyE. Microscopia de luz 40X.



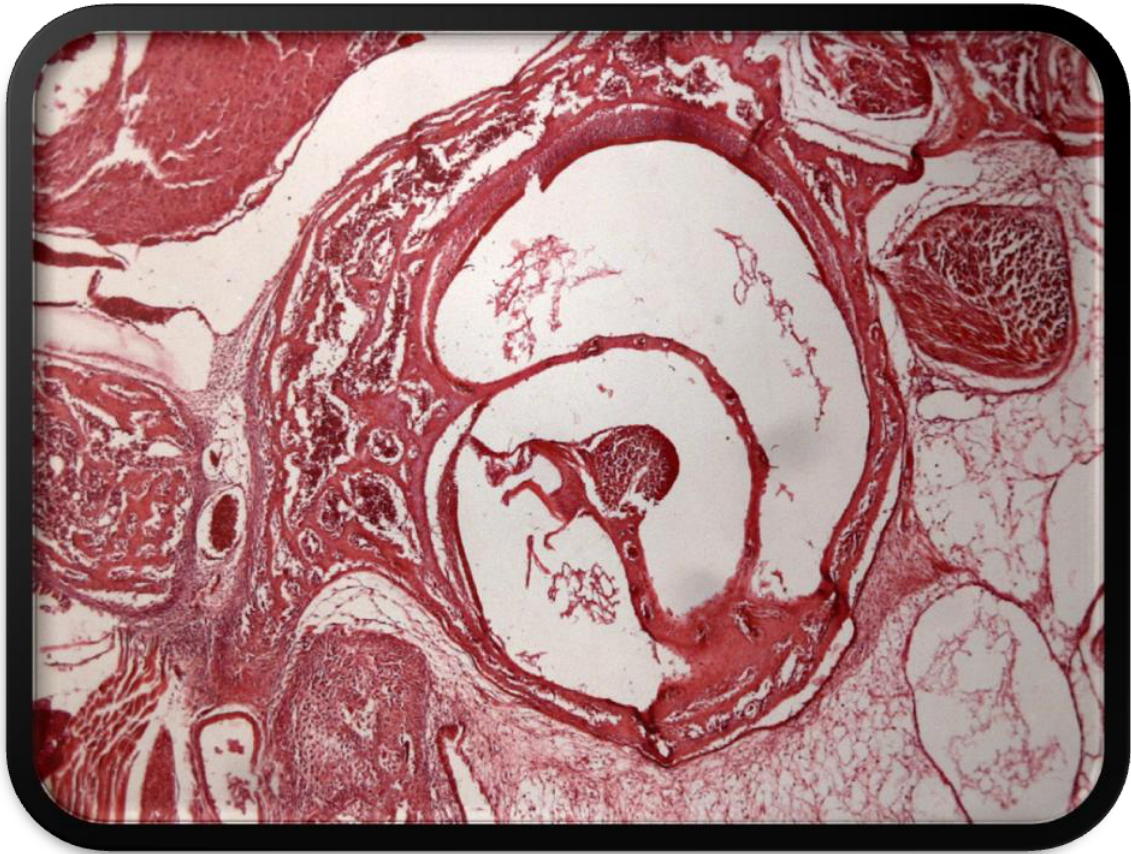
**Figura 32.** Corte del hemicráneo izquierdo rata de 21 días de gestación, acercamiento de una parte del conducto coclear. Se observa células irregulares con prolongaciones, con su núcleo redondo, teñido de rojo, el citoplasma se observa escaso de color verde, estas células se encuentran inmersas en lagunas, la técnica histológica hace que la célula se encoja y deforme y a microscopia de luz se pueden apreciar los condrocitos en lagunas que es el área blanca y en el interior el condrocito, rodeados de matriz, que ellos mismos secretan (CO);. Tinción HyE. Microscopia de luz 40X.



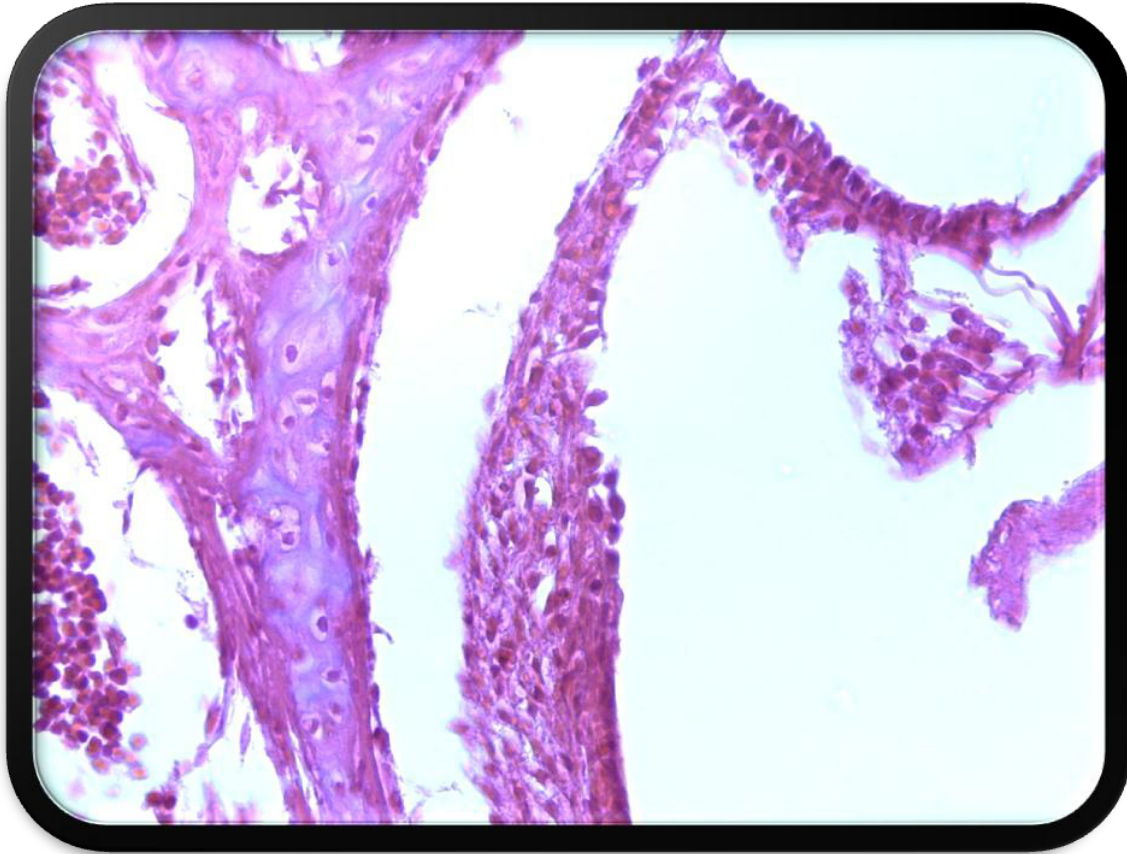
### 3.1.2 GRUPO POST- NATAL

#### 3.1.2.1 RATA DE 6 DIAS DESPUÉS DEL PARTO.

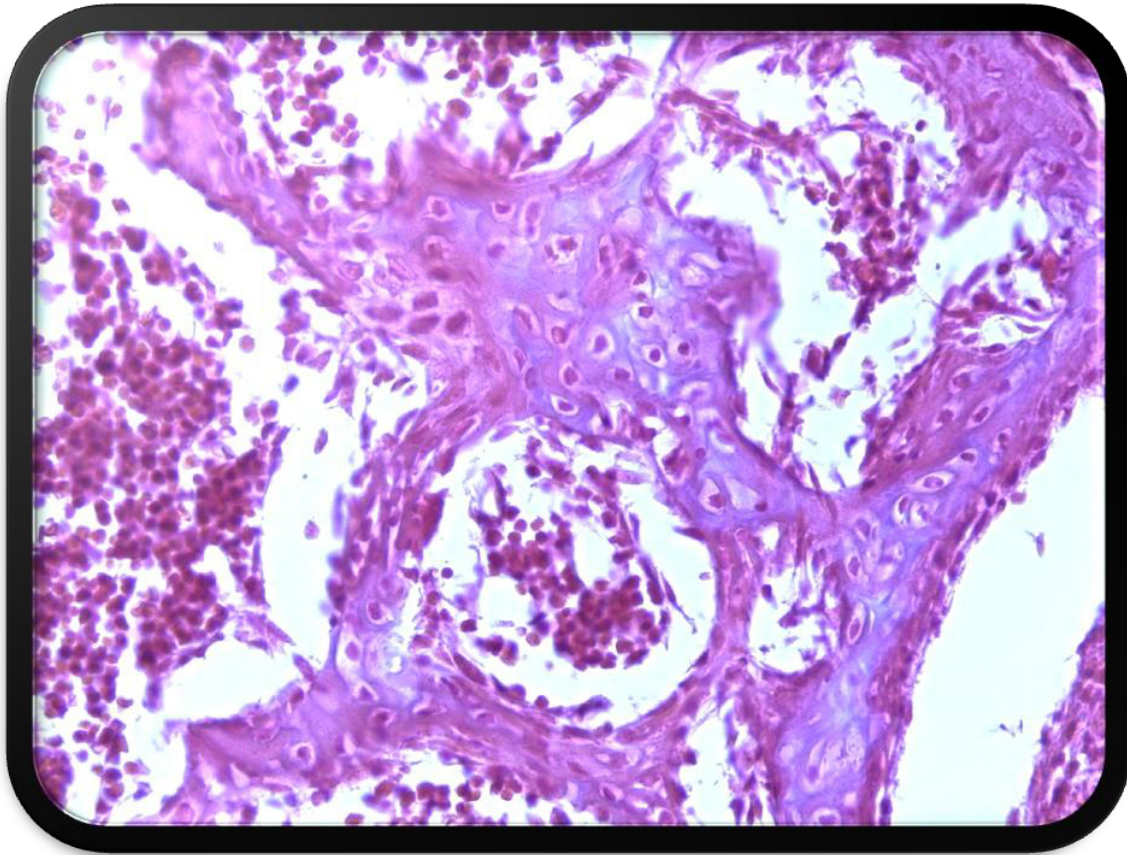
Se realizaron los cortes seriados de los productos de rata de 6 días de nacidos o días después del parto (ddp), Se seleccionaron las laminillas las cuales estaba presente el oído interno. Se observaron a microscopio de luz y por estéreo microscopio.



**Figura 33 .** Corte histológico del hemicráneo izquierdo de R 6ddp, con orientación frontal. En él se observa el conducto coclear ya más desarrollado, la capsula ótica que lo rodea se encuentra ya osificada. Tinción H y E. Microscopia de luz 5X.

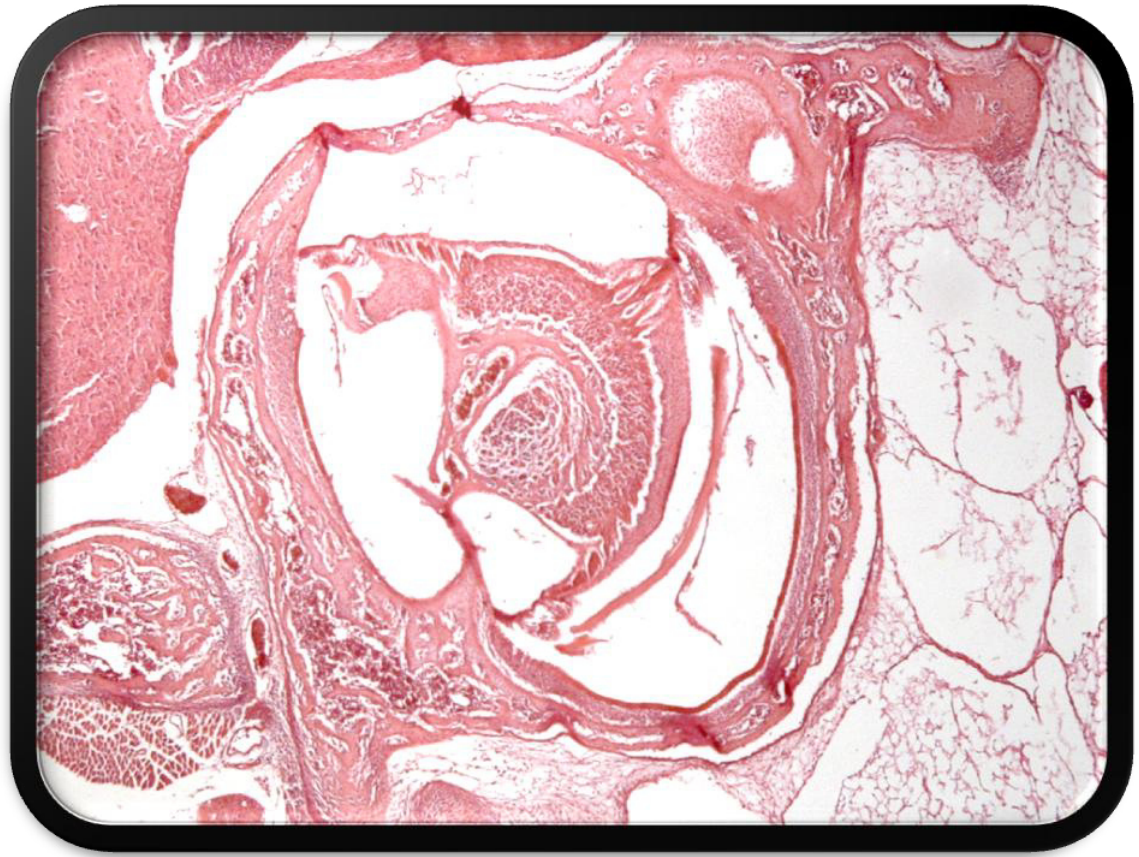


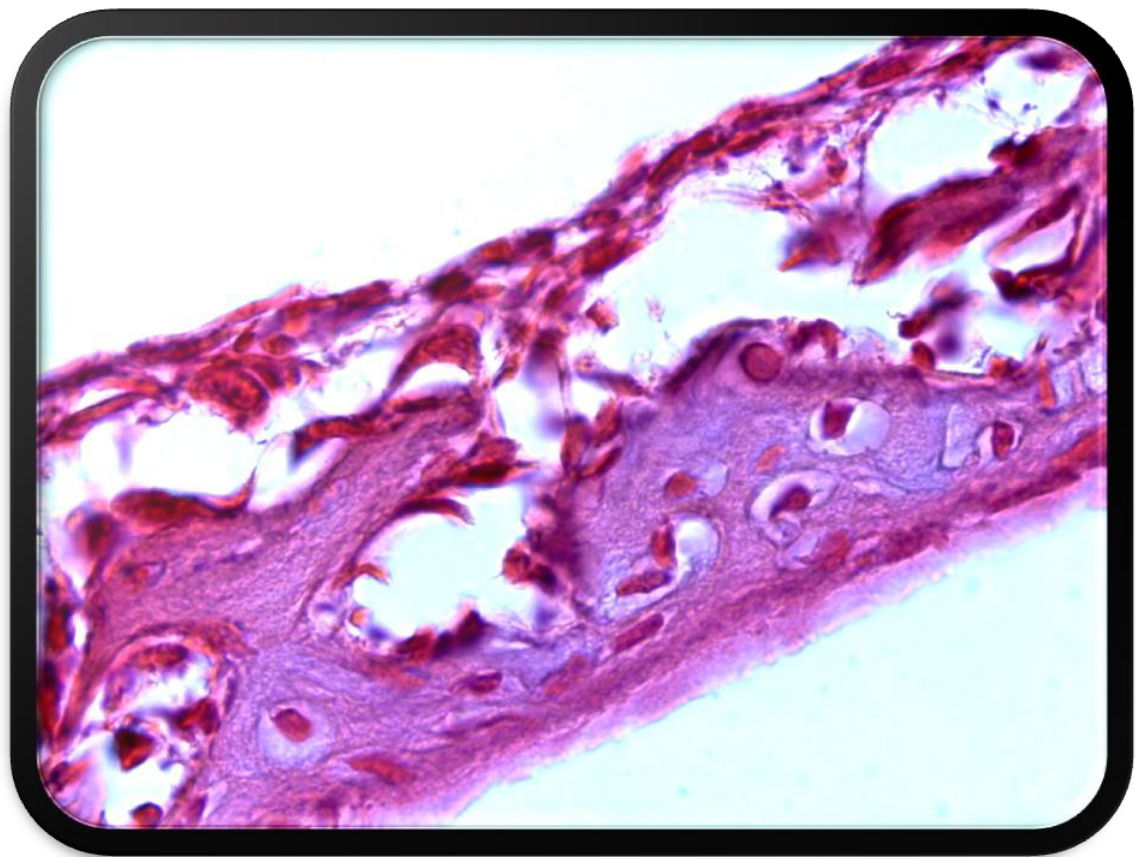
**Figura 34 .** Corte histológico del hemicráneo izquierdo de R 6ddp, con orientación frontal. Se observa una parte del conducto coclear, la parte membranosa, y rodeando a esta se encuentra la capsula ótica en proceso de osificación, se aprecian las trabéculas óseas, alrededor de estas se encuentran los osteoblastos los cuales son células entre cilíndricas a cubicas las cuales secretan matriz ósea, su citoplasma basófilo por su activación de secreción. Dentro de la trabéculas podemos observar tejido óseo de aspecto acidófilo, entremezclado con tejido cartilaginoso que aún persiste de aspecto basófilo. También se observan vasos sanguíneos los cuales contienen eritrocitos. Tinción H y E. Microscopia de luz 40X.

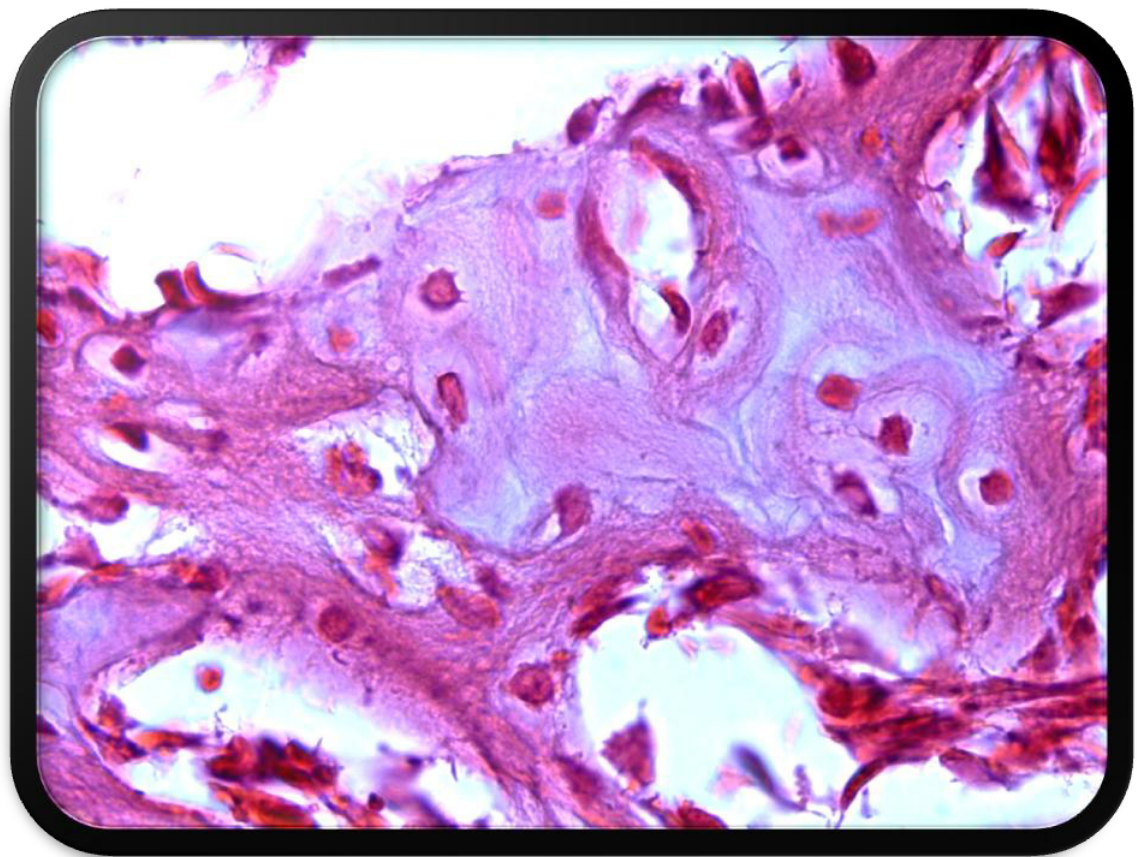


**Figura 35 .** Corte histológico del hemisféreo izquierdo de R 6ddp, con orientación frontal. Se observa la capsula ótica en proceso de osificación, igual que la micrografía anterior, dentro de la trabéculas podemos observar tejido óseo de aspecto acidófilo, entremezclado con tejido cartilaginoso que aún persiste de aspecto basófilo. También se observan vasos sanguíneos los cuales contienen eritrocitos. Tinción H y E. Microscopia de luz 40X.

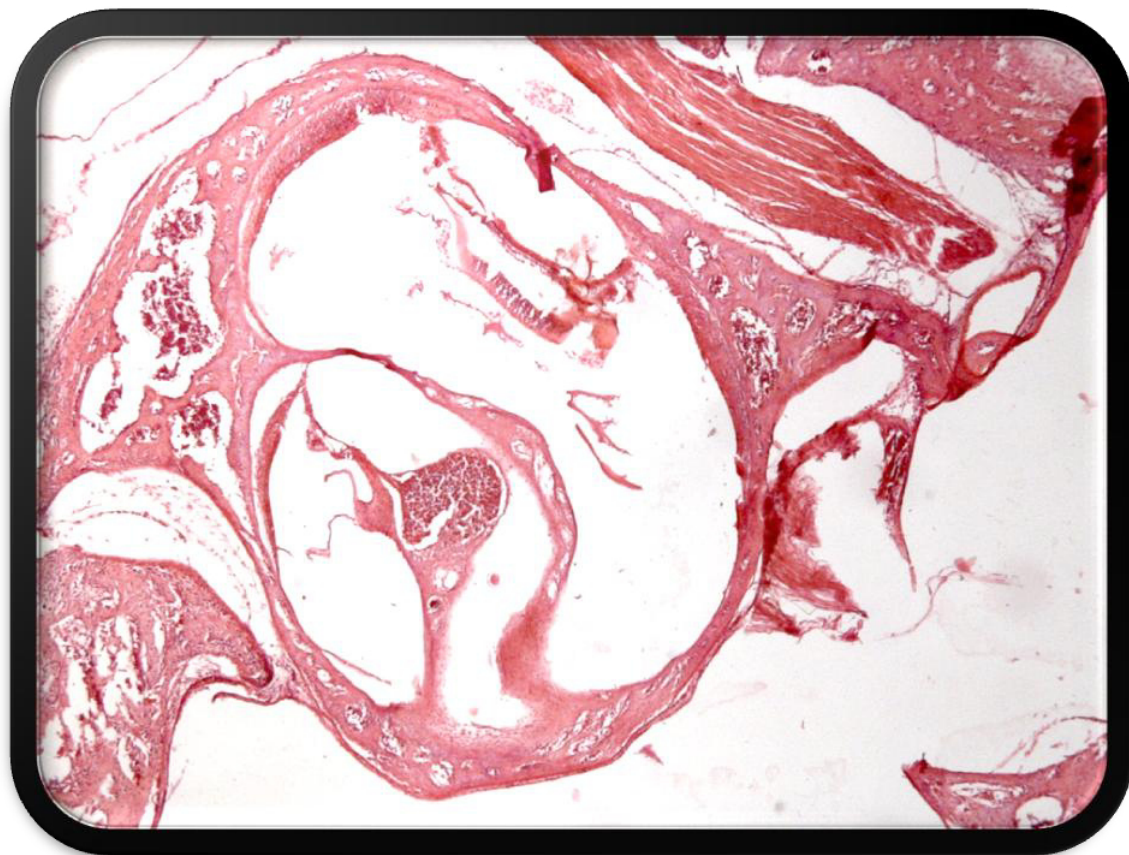


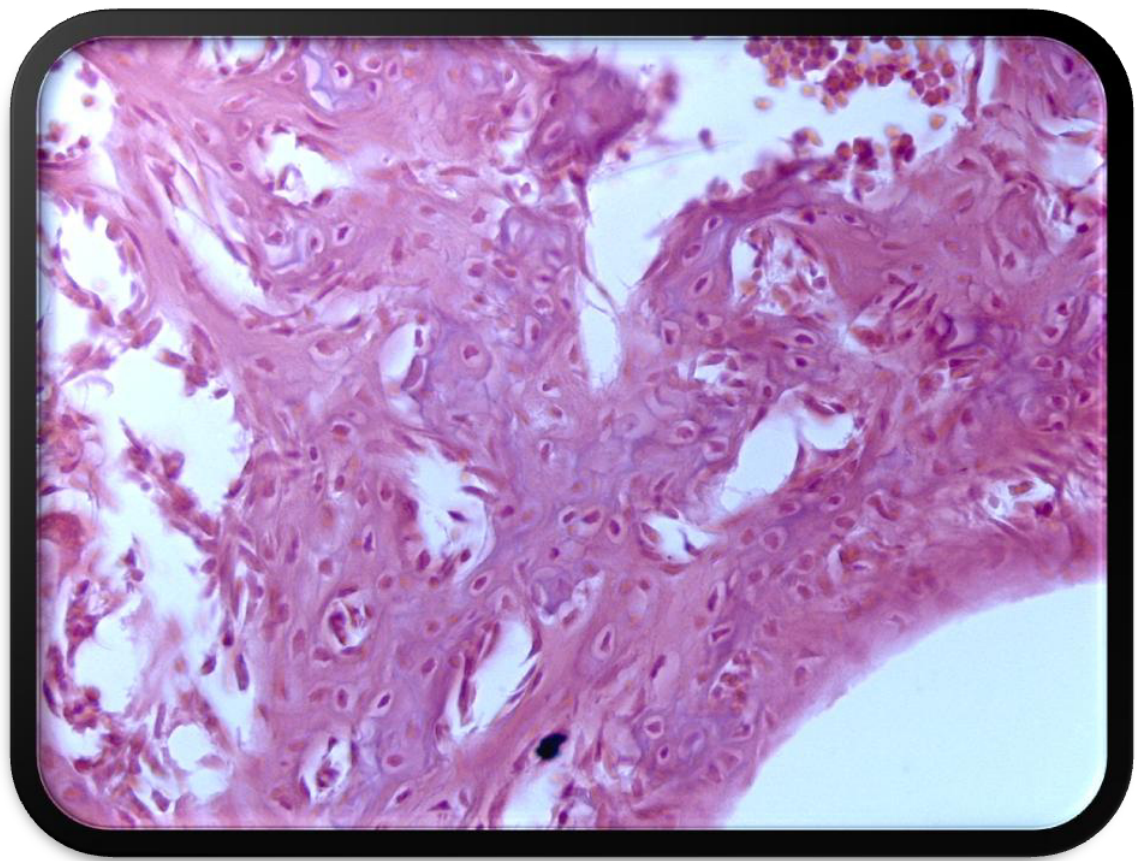












## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUCIÓN**

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

#### **5.1 CONCLUSIONES**

#### **5.2 PERSPECTIVAS**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **APENDICE A**

**A.1 TÉCNICA DE DESCALCIFICACIÓN .**

**A.2 TÉCNICA HITOLÓGICA PARA MUESTRAS EMBEBIDAS EN PARAFINA.**

**A.3 TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H y E).**

**A.4 TRICRÓMICO DE MASSON.**

**A.5 MÉTODO INMUNOHISTOQUIMICO PARA DETECTAR LA  
FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA , UTILIZANDO TUNEL.**

## **APENDICE B**

**SOLUCIONES:**

## **A P E N D I C E**